Aus der 2. Inneren Abteilung
des Städtischen Krankenhauses Berlin-Neukölln
(Dirigierende Ärztin: Prof. Dr. I. Boll)

Die Wirkung von Daunomycin auf die Proliferation von menschlichem leukämischen Knochenmark in vitro

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Karl-Ulrich Buch
aus Berlin

1976

Aus der 2. Inneren Abteilung
des Städtischen Krankenhauses Berlin-Neukölln
(Dirigierende Ärztin: Prof. Dr. I. Boll)

Die Wirkung von Daunomycin auf die Proliferation von menschlichem leukämischen Knochenmark in vitro

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Karl-Ulrich Buch

aus Berlin

Referent : Prof. Dr. med. I. Boll
Koreferent: Prof. Dr. med. H. Helge

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 20.4.1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gewidmet

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung ..... S. 1
1.1. Daunomycinwirkung im Tierversuch und in vitro
1.2. Wirkungsmechanismus/Angriffspunkt des Daunomycins
1.3. Metabolisierung des Daunomycins in vitro und vivo
1.4. Klinische Verwendbarkeit von Daunomycin

2. Fragestellung ..... S. 8

3. Methode ..... S. 9
3.1. Technik der Knochenmark-Kultivierung
3.2. Zählung der fixierten Kulturen
3.3. Art der Auswertung der so gewonnenen Werte

4. Ergebnisse ..... S. 14
4.1. Klinische Daten und Befunde der Knochenmark-Kulturen des Pat. H.N. ..... S. 14
4.2. Klinische Daten und Befunde der Knochenmark-Kulturen des Pat. A.G. ..... S. 20
4.3. Klinische Daten und Befunde der Knochenmark-Kulturen des Pat. K.F. ..... S. 26
4.4. Klinische Daten und Befunde der Knochenmark-Kulturen des Pat. M.K. ..... S. 32
4.5. Klinische Daten und Befunde der Knochenmark-Kulturen des Pat. I.K. ..... S. 36

5. Zusammenstellung der Ergebnisse ..... S. 45
5.1. Zelltoxicität
5.2. Mittlere Reifungskurve der Erythropoese
5.3. Mittlere Reifungskurve der Granulopoese
5.4. Zusammenfassung der G/E-Indices
5.5. Zusammenfassung der Mitoseindices
5.6. Mitosephasenverteilung
5.7. Signifikanzberechnung

6. Diskussion der Daunomycinwirkung auf die Knochenmark-Kulturen ..... S. 59

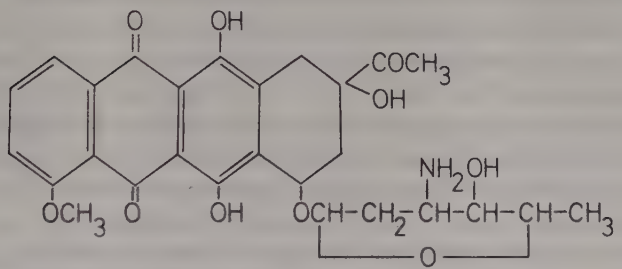
7. Zusammenfassung der Daunomycinwirkung auf die Knochenmark-Kulturen ..... S. 65

8. Anhang: Signifikanzberechnung ..... S. 66

9. Autorenverzeichnis ..... S. 68

E i n f ü h r u n g

Daunomycin ist ein Antibiotikum mit cytostatischer Wirkung. 1963 wurde es in Italien von GREIN (22) aus Streptomyces peucetius isoliert. Gleichzeitig fand DUBOST (19) diese Substanz auch in Frankreich, wo man sie infolge ihrer intensiv roten Farbe Rubidomycin nannte. Daunomycin setzt sich aus dem Chromophor Daunomycinon und dem Aminozucker Daunosamin, beide glycosidisch miteinander verbunden, zusammen. 1964 wurde seine Strukturformel von ARCAMONE und Mitarbeitern (2) veröffentlicht:



Die antimitotische Wirkung von Daunomycin wurde erstmals von DI MARCO und Mitarbeitern beschrieben. In einer Reihe von Veröffentlichungen (16,17,18) berichtete er über die Wachstumshemmung von auf Mäusen und Ratten transplantierten Tumoren durch Daunomycin.
COSTA und ASTALDI erprobten die Wirkung von Daunomycin auf die Proliferation von "Stammzellen", die von normalen menschlichen Lymphozyten abstammten, die in Gegenwart von Phytohämoagglutinin kultiviert worden waren.
Sie stellten nach Zusatz von Daunomycin in einer Endkonzentration von 1µg/ml eine Senkung des statmokinetischen Index (i.e. die Mitosehäufigkeit, bezogen auf teilungsfähige Zellen, nach Colchicin-Zusatz) um 1/3, nach Zusatz von 5 µg/ml um 5/6 des Ausgangswertes fest (10). Außerdem fanden sie eine Hemmung der

Umwandlung der Lymphozyten in Stammzellen unter Zusatz von Daunomycin in Stärken von o,2 - 5 γ/ml (11). DI MARCO beschrieb eine erhebliche Verminderung des Mitoseindex und des Prozentsatzes der mit ^{3}H-Thymidin markierten Zellkerne nach Behandlung synchronisierter Zellen mit Daunomycin (14).
Die Untersuchungen von WHANG-PENG an menschlichen Lymphozytenkulturen zeigten unter Daunomycineinwirkung eine Hemmung der RNS- und DNS-Synthese und eine Blockierung der Zellen in der G_2-Phase (44).
NAKAMURA berichtete über die Beeinflussung von humanen Leukämiezellen in vitro durch Daunomycin: bei einer Daunomycinkonzentration von 1 µg/ml sei die DNS-Synthese um 3o% herabgesetzt gewesen, die RNS-Synthese sei vergleichbar gehemmt worden; bei Zusatz von 5 µg/ml Daunomycin hätte das Maß der DNS-Synthesehemmung von Fall zu Fall stark differiert (32).
SKEEL und Mitarbeiter fanden eine Hemmung der Biosynthese der DNS um 89% und der RNS um 8o% nach Zusatz von 5 µg/ml Daunomycin bei Leukämiezellsuspensionen (37).
DI MARCO und Mitarbeiter zeigten, daß Daunomycin in einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml bis 1 µg/ml die nucleoläre RNS-Synthese um 7o% und die RNS-Synthese in der extranucleolären Zone des Kernes um 15% reduziert. Actinomycin D hingegen hemmt in einer Endkonzentration von 1 µg/ml die nucleäre RNS-Synthese völlig (15).
Es konnte gezeigt werden, daß Daunomycin in sehr spezifischer Weise Komplexe mit der DNS bildet, wobei es sich an beide Stränge der DNS-Helix bindet und dabei vorzugsweise mit den Purinnukleotiden reagiert (28,42). Durch diese Komplexbindung werden die Funktionen der DNS gestört, die eine Auftrennung der komplementären DNS-Stränge voraussetzen; abhängig von dem jeweiligen Aktivitätszustand der Zelle kommt es zu den folgenden Effekten (34):

In Zellen in der G_1-Phase kommt es zu einer Hemmung der m-RNS-Synthese und damit zu einer Hemmung der Enzymsynthese, u.a. auch der, die für die Reduplikation der DNS von Bedeutung ist.
In Zellen der S-Phase finden wir eine Hemmung der Reduplikation der DNS.
In Zellen in der G_2-Phase kommt es wieder zu einer Hemmung der nucleären RNS-Synthese, vielleicht auch der, die für die Auslösung des Mitoseprozesses entscheidend ist.

Allerdings ist die Hemmung der Enzymsynthese, der DNS-Reduplikation und der erwähnten messenger-RNS-Synthese nicht streng mit der antimitotischen Wirkung des Daunomycins verknüpft: es ließ sich bei HeLa-Zellen und Ratten-Sarkomzellen eine Erniedrigung des Mitoseindex nachweisen bei Daunomycin-Dosen, die nur eine geringgradige Hemmung des ^{3}H-Thymidineinbaus in die DNS bewirkten (23), auch läßt sich mit Daunomycin-Dosen, die keinen Effekt auf die RNS-Synthese in der G_2-Phase haben, eine Mitosehemmung erzielen (34), ferner kann man eine Mitosehemmung auch noch nach der Periode maximaler RNS-Synthese durch Gaben von Daunomycin erreichen (34). SILVESTRINI et al. (34) vermuten daher, daß die antimitotische Wirkung in diesen Fällen auf einer Veränderung der "Tertiärstruktur" der DNS durch Daunomycin beruht, die einen Übergang der interphasischen in die mitotische Form der Chromosomen nicht erlaubt.

Alle diese Effekte haben - wie bereits erwähnt - ihre Ursache in der Komplexbildung zwischen Daunomycin einerseits und der DNS andererseits.
Daunomycin (D_1) wird durch tierisches Gewebe in vitro zu folgenden Verbindungen ab- bzw. umgebaut (25):

dem Aglycon des Daunomycins,
dem Aglycon des Desoxydaunomycins,
dem Daunorubicinol (=Daunomycin mit hydrierter Carbonylgruppe),
dem Aglycon des Daunorubicinols,
dem Aglycon des Desoxydaunorubicinols.

Bei in vitro Versuchen mit den Bestandteilen des menschlichen Blutes (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten) fanden HUFFMAN et al. (26) als einzigen Metaboliten Daunorubicinol (D_2). Während die Aglycone biologisch inaktiv sind (13), besitzt D_2 eine cytostatische Wirkung (1) und hemmt wie die Muttersubstanz den Nucleinsäurestoffwechsel bei einer experimentell erzeugten Mäuseleukämie (31).

Die Metabolisierung des D_1 zum D_2 geschieht mittels eines im Cytoplasma lokalisierten, NADPH abhängigen Enzyms, der Daunomycinreduktase (27). Dieses Enzym wurde bisher in Erythrozyten, Erythroblasten, Leukozyten und in Rattengewebe gefunden (27).
HUFFMAN et al. zeigten, daß die D_1-Reduktasen der normalen Leukozyten und der leukämischen Leukozyten (27) sowie die der Erythrozyten gesunder und leukämiekranker Patienten (24) sich nicht in ihrer Kinetik unterscheiden. Hingegen findet man in leukämischen Myeloblasten einen vier- bis neunfach höheren Enzymspiegel als in normalen reifen Leukozyten (27); die D_1-Reduktaseaktivität der Erythrozyten gesunder und leukämiekranker Patienten ist gleich (27).
ALBERTS et al. (1) ermittelten bei Patienten mit soliden Tumoren eine Plasmahalbwertzeit von 55 Stunden für die Daunomycingesamtfluoreszenz. HUFFMAN et al. (25) entdeckten bei ihren Untersuchungen mit nicht-lymphatisch leukämiekranken Patienten eine Plasmahalbwertzeit von 3o Stunden für die Gesamtfluoreszenz, die hauptsächlich aus

der Fluoreszenz des Daunomycins, des Daunorubicinols und eines bis dahin unbeschriebenen Metaboliten D_5 besteht. Während die Plasmakonzentration von Daunorubicinol nach einer Stunde ihr Maximum erreicht hat und dann linear abfällt, hat die des Metaboliten D_5 ihren Höhepunkt erst nach 8 Stunden erreicht, bleibt dann bis 24 Stunden relativ konstant, um dann langsam abzusinken (25). Einmal gebildet, liegt die Plasmakonzentration und in 4 von 8 Fällen auch die Halbwertzeit des Daunorubicinols wesentlich höher als die der Muttersubstanz (25).
Daunorubicinol und D_5 werden wie die Muttersubstanz in bestimmten Geweben bevorzugt gebunden (25):

Daunomycin	in Pankreas, Nieren, Leber und Milz,
Daunorubicinol	in Pankreas, Nieren und Leber,
D_5	in Pankreas, Nieren, Leber und Herz.

Der hohe prozentuale Anteil des D_5 (77%) an der Daunomycingesamtfluoreszenz des Herzmuskelgewebes führte zu der Vermutung, daß der Metabolit D_5 für die cardiotoxische Wirkung des Daunomycins verantwortlich sei (25).
Dem Daunorubicinol schreibt HUFFMAN eine den Zelltod begünstigende Wirkung zu (25), zumal eine Verknüpfung von hohem Daunomycinreduktasespiegel und Therapieerfolg unter Daunomycin zu bestehen scheint (27).

Untersuchungen (5,12,21,30,36,38,39,40) über die Verwendbarkeit des Daunomycins bei neoplastischen Erkrankungen des Menschen zeigten seine besondere Wirksamkeit bei den

1. akuten Leukämien
2. Neuroblastomen
3. Rhabdomyosarkomen

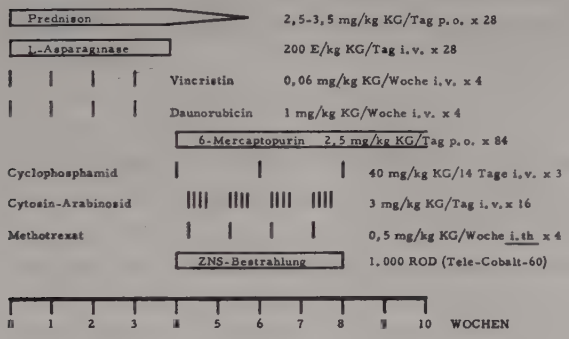
SOULIÉ (38) erreichte nach Verabreichung von Daunomycin bei 38 Fällen akuter Lymphoblastenleukämien 22 komplette Remissionen. In 43 Fällen akuter myeloischer Leukämie kam es zu 22 kompletten und 6 inkompletten Remissionen. TAN (41) gibt eine Rate von 6o% kompletter oder teilweiser Remissionen bei akuten Leukämien von Kindern und GERHARTZ (21) von 5o% bei akuten Leukämien Erwachsener unter Daunomycintherapie an.

SOULIÉ wie GERHARTZ unterstreichen die besonders gute Wirksamkeit des Daunomycins gegen die akute Lymphoblastenleukämie.
Bei der Therapie mit Daunomycin kommt es zwischen dem 3. und 1o. Behandlungstag zu einer Leukopenie und zu einem deutlichen Abfall bzw. Verschwinden der Blasten aus dem peripheren Blut (4).
Im Knochenmark können die Blasten noch Tage nach einer Injektion von Daunomycin persistieren. Sie weisen jedoch verschiedene Läsionen auf, so daß die Vermutung naheliegt, daß schon durch eine einmalige Injektion von Daunomycin die Schädigung der leukämischen Zellen gesetzt wird, die dann erst im Verlauf von Tagen zu dem langsamen Zerfall dieser Zellen führt (33).
Wie die meisten hoch wirksamen Medikamente hat auch das Daunomycin erhebliche Nebenwirkungen, deren Ausmaß vom Alter und Allgemeinzustand des Patienten, der Therapiedauer und der Dosishöhe abhängig ist. Mögliche toxische Nebenwirkungen sind (41):

1. eine Knochenmarkdepression, mit daraus resultierender Leukopenie, Anämie und Thrombozytopenie,
2. gastrointestinale Störungen wie Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoen,
3. Fieber,
4. Ulcera der Mundschleimhaut,
5. Haarausfall,
6. große lokale Toxicität (Paravenöse Injektion führt zu ausgedehnten Nekrosen).

BONNADONNA (9) beschreibt eine cardiotoxische Wirkung von Daunomycin, die bei Kindern dosisabhängig zu sein scheint, bei Erwachsenen hingegen nicht und die bei letzteren dann ganz akut auftreten kann. Die Anwendung von Daunomycin sollte daher auf die akuten Leukämien des Kindes und Jugendlichen beschränkt werden (29).

Ferner wird man heute Daunomycin nur noch im Intervall und in Kombination mit anderen Medikamenten geben, so wie z.B. in folgendem Behandlungsschema aus der Universitätskinderklinik Berlin*:



*Riehm, H., Gardner, H., Jessenberger, K., Odenwald, E., Tariverdian, G., Vortisch, M. und Stück, B. (Berlin): Radikale kombinierte Chemo- und Radiotherapie der akuten Leukämie des Kindes - erster Erfahrungsbericht. in Leukämie, Gross, R. und van de Loo, J. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S.545 (1972)

Fragestellung

Die direkte Wirkung von Daunomycin auf die Proliferation menschlicher Knochenmarkzellen, unbeeinflußt durch das Nervensystem oder die Verstoffwechselung im Organismus, ist bisher nur an Kulturen, die von nicht an Leukämie erkrankten Spendern stammten, von WELT untersucht worden (43).

Mit Proliferation meinen wir hier die wechselweise Beziehung von Regeneration (=Zellmultiplikation) und Reifung(7).

Die Frage nach dem Verhalten leukämischer Knochenmarkzellen in Kulturen mit und ohne Zusatz von Daunomycin soll nun diese Arbeit untersuchen.

M e t h o d e

Als Material standen Knochenmarkpunktate von an Leukämie erkrankten Patienten zur Verfügung, fünf wurden ausgewertet. Von jedem Knochenmarkpunktat wurden ein Originalausstrich, eine Kontrollkultur und eine Kultur mit endgültigen Daunomycinkonzentrationen von 1 µg/ml bzw. 5 µg/ml bzw. 1o µg/ml angelegt.
Bei der Wahl der wirksamen Endkonzentration von Daunomycin von 1 µg/ml bzw. 5 µg/ml stützten wir uns auf WELT (s.o.) und auf NAKAMURA (32), der bei diesen Konzentrationen eine Hemmung der DNS-Synthese bei Leukämiezellen in vitro fand, wie auch auf SKEEL (37), der bei 5 µg/ml Daunomycin eine Hemmung der DNS und RNS-Synthese zu 89% und 8o% beschreibt.
Versuchsweise wurde bei einer Kulturreihe auch eine Daunomycinkonzentration von 1o µg/ml verwandt.
Die Kultivierung der Knochenmarkpunktate erfolgte nach dem von BOLL (7) modifizierten Verfahren von CARELL:

> Auf ein Koagulum, das aus 5 Tropfen Nativplasma des Patienten, drei Tropfen Serum des Patienten, einem Tropfen Corhormon(R) 3-fach verstärkt und einem Tropfen einer 1o µg/ml bzw. 5o µg/ml bzw. 1oo µg/ml Daunomycinhaltigen Serum-Lösung besteht, gibt man einen Bröckel des Sternalmarkpunktates. Um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern, gibt man noch ein Tröpfchen einer Lösung, bestehend aus neun Tropfen Patientenserum und einem Tropfen einer 1o µg/ml bzw. 5o µg/ml bzw. 1oo µg/ml haltigen Daunomycinlösung, auf das Knochenmark. Bei den Kontrollkulturen verwendet man jedesmal statt des Tropfen der jeweiligen Daunomycinlösung einen Tropfen Patientenserum. Über der nun fertigen Kultur, die sich auf einem 77 mal 26 mm großen Objektträger befindet, wird ein Hohlschliffobjektträger befestigt. Dann wird das Ganze umgedreht, so daß die Kultur in die Höhlung des Hohlschliffobjektträgers hineinhängt. Die Deckglasränder werden mit Hartparaffin abgedichtet

und die Kulturen bei 37°C inkubiert.
Das Ansetzen der Kulturen erfolgt unter handsterilen Kautelen.

Jeden Tag werden dann von den Kulturen Ausstriche angefertigt, fixiert und nach Pappenheim gefärbt.
Die Ausstriche zählten wir mäanderförmig, mit Bevorzugung der lockeren Randgebiete, bei 1000-facher Vergrößerung aus.
Von den zur gleichen Zeit angefertigten Ausstrichen der jeweiligen Kultur differenzierten wir 1000 bis 2000 Zellen in folgende Zellklassen:

Erythropoese:	Proerythroblasten	(PE)
	basophile Erythroblasten	(bE)
	polychromatische Erythroblasten	(pE)
	oxyphile Erythroblasten	(oE)
	reife Erythroblasten	(rE)
Granulopoese:	Myeloblasten	(Mb)
	Promyelozyten	(Pmy)
	neutrophile Myelozyten	(My)
	eosinophile Myelozyten	(Eo)
	basophile Myelozyten	(Ba)
	Promonozyten	(PM)
	Metamyelozyten	(MM)
	stabkernige Granulozyten	(Stab)
	neutrophile segmentkernige Granulozyten	(Seg)
	eosinophile segmentkernige Granulozyten	(Eo)
	basophile segmentkernige Granulozyten	(Ba)
	Monozyten	(Mo)

RHS:
kleine Reticulumzellen
große Reticulumzellen
phagozytierende Reticulumzellen
Plasmoblasten
Plasmazellen
Lymphoblasten
Lymphozyten

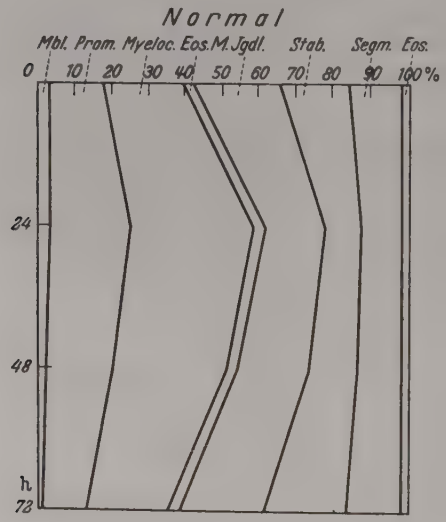
Bei der Differenzierung nach morphologischen Merkmalen orientierten wir uns an den Zellbeschreibungen von BÖLL (7) und BÖLL und MERSCH (8).
Die eosinophilen und basophilen Metamyelozyten zählten wir zu den entsprechenden Myelozyten, die eosinophilen und basophilen Stäbe zu den entsprechenden Segmentkernigen.
Bei der Erythropoese wurden mit Ausnahme der reifen Erythroblasten alle Zellklassen als teilungsfähig angesehen, bei der Granulopoese alle Zellklassen mit Ausnahme der stabkernigen und segmentkernigen Granulozyten.
Ferner wurden die Monozyten als nicht mehr teilungsfähig angesehen.

Zwischen Megaloblasten und Normoblasten wurde nicht unterschieden. Die Beurteilung der jeweiligen Mitosephasen (Pro-, frühe Meta-, späte Meta-, Ana-, Telo- und Rekonstruktionsphase) erfolgte nach den Beschreibungen von BÖLL (7,8).

Die Proliferationsaktivität menschlicher Knochenmarkzellen in vitro während drei Tagen wurde von uns an Hand folgender Kriterien beurteilt:

1. Reifungskurve:
   Sie zeigt die prozentuale Verteilung der einzelnen Reifungsstufen der Granulo- bzw. Erythropoese -additiv aufgetragen- auf der Abszisse.
   Auf der Ordinate finden wir die jeweiligen Bebrütungszeiten der Kulturen.

Die folgende Reifungskurve zeigt das Verhalten der normalen Granulopoese in vitro, gezählt aus fixierten Kulturen (gemittelt von 10 Patienten) (7).



2. G/E-Index:
   Er ist der Quotient aus der Gesamtzahl der Zellen der granulopoetischen und der erythropoetischen Reihe. Ein Absinken des G/E-Index bedeutet also eine relative Zunahme der erythropoetischen Zellen.

3. Mitoseindex:
   Wir unterscheiden den roten Mitoseindex (rMI) vom weißen Mitoseindex (wMI) und verstehen darunter das Verhältnis der Anzahl der Mitosen zu der Zahl der teilungsfähigen Zellen und geben ihn in °/oo an.

4. Karyologische Kurve:
   Sie zeigt die prozentuale Verteilung der einzelnen Mitosephasen (Ordinate: Mitosehäufigkeit in %, Abszisse: Mitosephasen).

*Die Signifikanzberechnung auf abweichende Zell- und Mitosenverteilung für Kontroll- und Zusatzkulturen wurde nach dem χ^2-Test durchgeführt.

*Beratung: Prof. Dr. H.-J. Belitz,
Freie Universität Berlin

E r g e b n i s s e

Die Wirkung von Daunomycin auf die Proliferation der Knochenmarkzellen - insgesamt 67.118 - wurde an den Kulturen folgender fünf Patienten untersucht:

1. Patient H.N. Alter: 62 Jahre

Die Patientin kam am 2o.5.1970 wegen des Verdachtes auf eine Leukose zur ambulanten Behandlung in das Neuköllner Krankenhaus.

Klinischer Befund: Milz ca. 2 Querfinger verbreitert, Patientin sonst beschwerdefrei.

Blutbild am 7.7.1970:	Erythrozyten	4,07 Mill/µl
	Hb	13,0 g%
	HbE	31,8 pg
	Leukozyten	20.000/µl
	Thrombozyten	366.000/µl
Differentialblutbild:	Promyelozyten	1%
	Myelozyten	1%
	stabkernige Granulozyten	6%
	segmentkernige Granulozyten	79%
	eosinophile Granulozyten	1%
	basophile Granulozyten	1%
	Monozyten	2%
	Lymphozyten	9%

Andere Laborwerte:

BSG am 15.6.1970: 16/32 mm n.W.
alkalische Leukozytenphosphatase: negativ

Medikation vor der KM-Punktion:

Herzglycoside
Sedativa

Sternalpunktat vom 7.7.1970:

Die Granulopoese ist nicht wesentlich verschoben, aber vermehrt (G/E-Index: 10,9). Der wMI ist mit 8,7 °/oo leicht erniedrigt. Die PAS und Peroxidasereaktion sind gut positiv. Die Erythropoese ist stark vermindert, nicht verschoben und normoblastisch. Der rMI ist mit 6,5 o/oo deutlich erniedrigt. Die Erythroblasten sind PAS-negativ, die Berliner-Blau-Reaktion ist gleichfalls negativ.

Diagnose: beginnende chronisch myeloische Leukämie.

Reifungskurve der Erythropoese in vitro: Tab. 1, Abb. 1

Nach 24 Stunden fällt nach Zusatz von Daunomycin eine leichte prozentuale Abnahme der polychromatischen zu Gunsten der oxyphilen Erythroblasten auf.
Nach 48 Stunden sehen wir unter Daunomycin eine deutliche Verschiebung der Kurven nach links. (Wenn wir von einer Links- oder Rechtsverschiebung der Reifungskurven sprechen, so verstehen wir das rein deskriptiv und nicht im Sinne Rohrs).
Nach 72 Stunden sieht man unter Daunomycin eine geringe Zunahme der polychromatischen und oxyphilen Erythroblasten gegen die Kontrollkultur.

Reifungskurve der Granulopoese in vitro: Tab. 1, Abb. 2

Nach 24 Stunden kommt es unter Daunomycin zunächst zu einer deutlichen Rechtsverschiebung der Kurve, in den darauffolgenden 48 Stunden aber doch zu einer gegenüber der Kontrollkultur beschleunigten Ausreifung.
Wir sehen nach 72 Stunden eine ausgeprägte Linksverschiebung der Kurven: während der prozentuale Anteil der nicht mehr teilungsfähigen weißen Zellen bei der Kontrollkultur nur 21,2% beträgt, beläuft er sich unter Daunomycinzusatz auf 48,2%. Die unterschiedliche Zellverteilung nach 72 Stunden der Kontroll- und Zusatzkultur ist hochsignifikant ($p < 0,001$).

G/E-Indices: Tab. 8, S. 51

Nach 24 Stunden finden wir unter Daunomycin eine leichte, nach 72 Stunden eine ausgeprägte Depression der Granulopoese.

Mitosen: Tab. 9, S. 53

Alle Mitoseindices der roten und weißen Reihe sind unter Daunomycin erniedrigt.

T a b e l l e 1

(Pat. H.N., Kultur I)

Prozentuale Zellverteilung in der Erythropoese

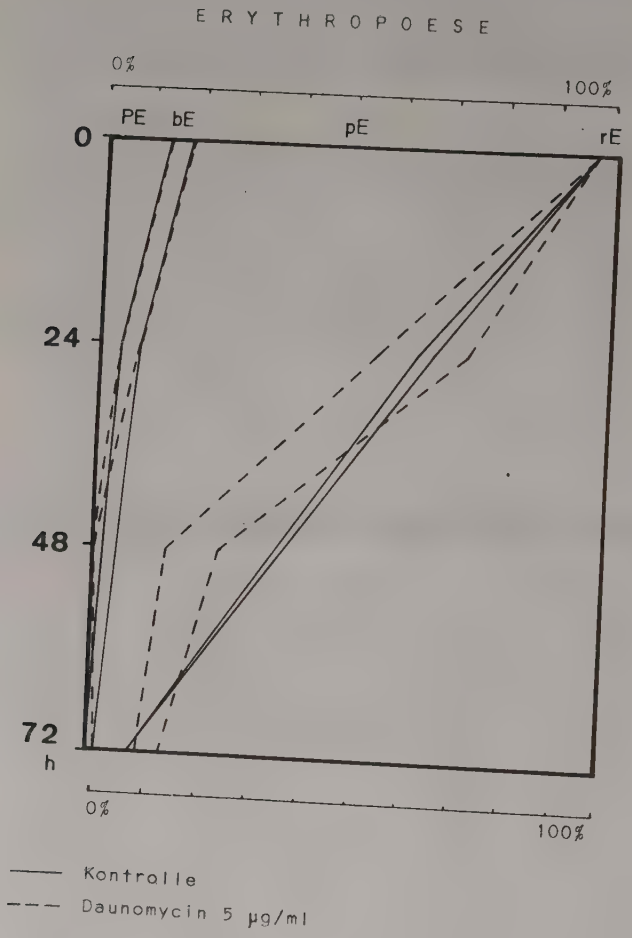
	24 h		48 h	72 h	
	K(%)	Z(%)	Z (%)	K (%)	Z(%)
PE	3,5	3,8	-	-	-
bE	4,0	3,8	-	1,6	1,3
pE	55,0	47,1	14,3	7,0	8,2
oE	3,0	17,3	10,4	-	4,7
rE	34,5	28,0	75,3	91,4	85,8
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Prozentuale Zellverteilung in der Granulopoese

	24 h		48 h	72 h	
	K(%)	Z(%)	Z (%)	K (%)	Z (%)
Mb	4,8	4,5	-	1,9	1,4
Pmy	19,0	28,2	4,9	10,4	16,2
My	11,0	20,7	56,0	50,1	13,4
Eo	4,0	17,2	-	10,6	13,7
Ba	-	1,9	-	-	-
PM	1,6	2,4	-	-	2,3
MM	6,5	6,0	12,0	5,8	4,8
Stab	5,0	2,4	3,7	1,8	11,0
Seg	42,0	9,0	23,4	16,4	27,7
Eo	2,5	4,7	-	-	4,0
Ba	-	-	-	-	-
Mo	3,6	3,0	-	3,0	5,5
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

K = Kulturen ohne Daunomycinzusatz
Z = Kulturen mit einer Daunomycinkonzentration von 5 µg/ml

Abbildung 1 (Patient H.N., beginnende chronisch myeloische Leukämie)

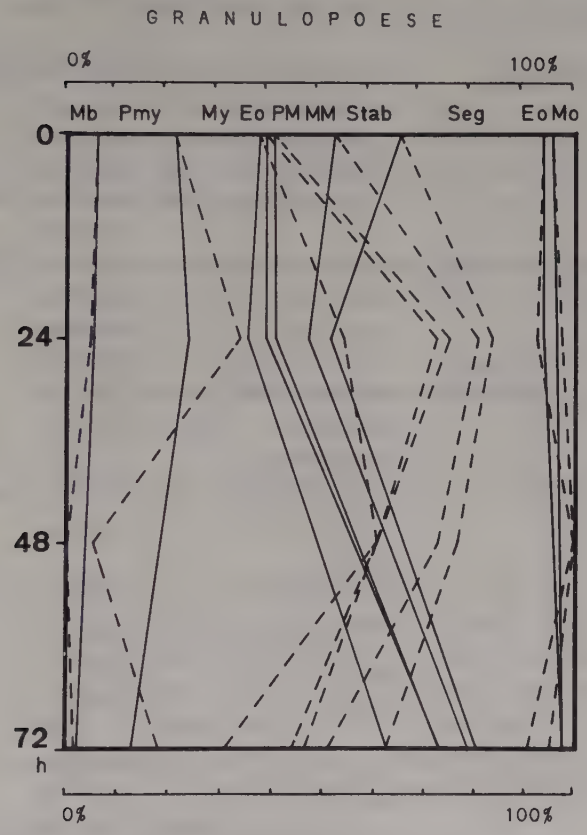


Abszisse: Prozentualer Anteil der einzelnen Reifungsstufen, addierend aufgetragen.

Ordinate: Inkubationszeit der
Kontroll-Kulturen: 24 und 72 Stunden,
Zusatz-Kulturen : 24, 48 und 72 Stunden.

Zeichenerklärung siehe S. 10.

Abbildung 2 (Patient H.N., beginnende chronisch myeloische Leukämie)



Abszisse: Prozentualer Anteil der einzelnen Reifungsstufen, addierend aufgetragen.

Ordinate: Inkubationszeit der
Kontroll-Kulturen: 24 und 72 Stunden
Zusatz-Kulturen : 24, 48 und 72 Stunden.

Zeichenerklärung siehe S. 10

11. Patient A.G. Alter: 75 Jahre

Die Patientin kam am 27.11.1969 zur ambulanten Behandlung ihrer seit einem Jahr bestehenden Leukozytose (20.000).

Klinischer Befund:

1. Leber ca. 1 Querfinger verbreitert
2. Milz nicht tastbar
3. Gon- und Coxarthrose
4. Herpes zoster am rechten Arm
5. Hypertonus und Coronarsklerose

Blutbild am 16.10.69:		
	Erythrozyten	4,34 Mill/µl
	Hb	13,5 g%
	Leukozyten	22.800/µl

Differentialblutbild:		
	Promyelozyten	1%
	Myelozyten	0%
	stabkernige Granulozyten	24%
	segmentkernige Granulozyten	58%
	eosinophile Granulozyten	0%
	basophile Granulozyten	0%
	Monozyten	6%
	Lymphozyten	11%

Andere Laborwerte:

alkalische Leukozytenphosphatase: 170

BSG 30/61 mm n.W.

Papierelektrophorese: ß-Globuline 23,4%

C-reaktives Protein und Latex-Test: negativ

Antistreptolysintiter unter 5o ASE

Medikation vor der KM-Punktion:

1. Herzglycoside
2. Antihypertonica

Sternalpunktat vom 3.12.1969:

Das spezifische Gewicht liegt über 1,1.
Die Granulopoese ist nicht wesentlich verschoben, aber vermehrt (G/E-Index liegt bei 7,2). Der wMI liegt mit 15,1 °/oo im Normbereich.
Die Erythropoese ist vermindert, rechtsverschoben und normoblastisch. Der rMI liegt mit 13,8 °/oo im Normbereich.
Man sieht vereinzelt Plasmazellen, zum Teil mehrkernige und Megakaryozyten in allen Reifungsstufen.

Diagnose: Verdacht auf beginnende chronische Myelose.

Reifungskurve der Erythropoese in vitro: Tab. 2, Abb. 3

Nach 8 Stunden kommt es unter Daunomycin zu einer Abnahme der polychromatischen Erythroblasten zu Gunsten der reifen Erythroblasten.
Nach 3o Stunden sehen wir nach Daunomycin eine geringe Rechtsverschiebung der Kurven.
Nach 48 Stunden fällt eine starke Linksverschiebung unter Daunomycin auf.
Nach 72 Stunden sieht man unter Daunomycin noch basophile und polychromatische Erythroblasten, in den Ausstrichen der Kontrollkultur hingegen nicht mehr.

Reifungskurve der Granulopoese in vitro: Tab. 2, Abb. 4

Wir finden eine zunehmende Linksverschiebung der Kurven unter Daunomycin.
So beträgt nach 72 Stunden unter Daunomycin der prozentuale Anteil der nicht mehr teilungsfähigen weißen Zellen 44,8%, bei der Kontrollkultur hingegen nur 2o,4%.
Die unterschiedliche Zellverteilung der Kontroll- und Zusatzkultur nach 72 Stunden ist hochsignifikant ($p < 0,001$).

G/E-Indices: Tab. 8, S. 51

Zunächst sehen wir nach 8 Stunden unter Daunomycin eine Abnahme des G/E-Index gegen die Kontrollkultur, nach 24 und 48 Stunden eine Zunahme und nach 72 Stunden wieder einen starken Abfall des G/E-Index unter Daunomycin.

Mitoseindex: Tab. 9, S. 53

Sämtliche Mitoseindices sind bei Daunomycinzusatz erniedrigt.

Tabelle 2

(Pat. A.G., Kultur II)

Prozentuale Zellverteilung in der Erythropoese

	8 h		3o h		48 h		72 h	
	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)
PE	6,3	4,0	-	3,2	-	1,0	-	-
bE	6,3	5,7	2,5	5,4	5,3	2,0	-	2,3
pE	61,4	37,4	29,0	30,3	36,5	4,2	-	3,1
oE	-	4,0	4,1	3,1	3,9	3,6	2,6	1,0
rE	26,0	48,9	64,4	58,0	54,3	89,2	97,4	93,6
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

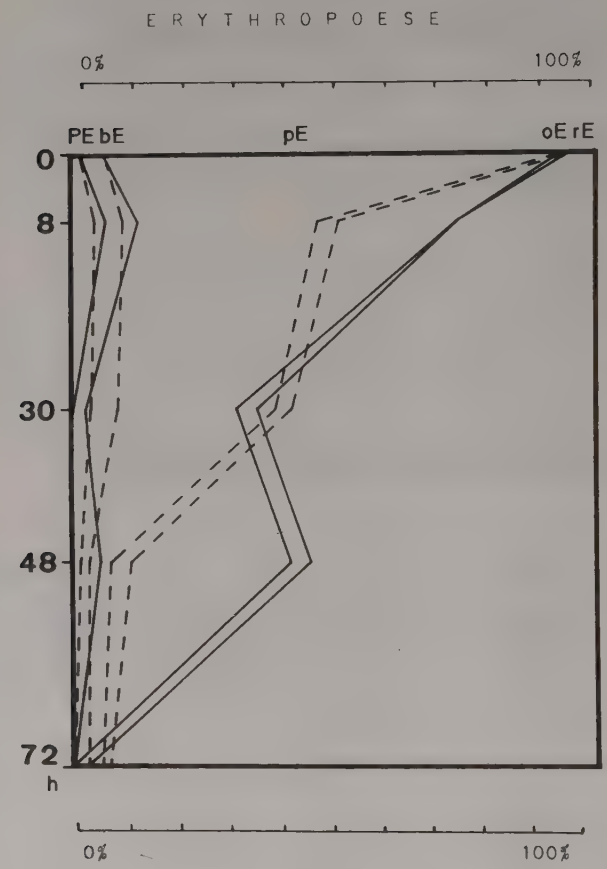
Prozentuale Zellverteilung in der Granulopoese

	8 h		3o h		48 h		72 h	
	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)
Mb	16,9	14,2	18,2	20,7	4,4	5,1	9,6	6,3
Pmy	55,1	41,3	25,5	25,3	14,7	7,6	22,7	9,2
My	7,3	16,3	21,5	16,4	26,5	23,3	28,o	21,5
Eo	3,1	4,0	2,6	4,6	5,1	3,4	2,5	9,6
Ba	-	-	-	-	-	-	-	-
PM	2,0	2,8	9,6	6,0	13,0	7,3	15,3	4,6
MM	2,0	2,1	3,1	1,5	3,3	4,6	1,5	3,0
Stab	5,o	4,o	5,8	1,0	9,4	8,7	2,6	9,6
Seg	5,0	10,2	6,1	14,6	12,5	28,7	5,6	20,2
Eo	1,1	1,2	2,2	1,7	2,7	2,5	3,4	6,5
Ba	-	-	-	-	-	-	-	-
Mo	2,5	3,9	5,4	8,2	8,4	8,8	8,8	9,5
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

K = Kulturen ohne Daunomycinzusatz

Z = Kulturen mit einer Daunomycinkonzentration von 5 µg/ml

Abbildung 3 (Patient A.G., Verdacht auf beginnende chronische Myelose)

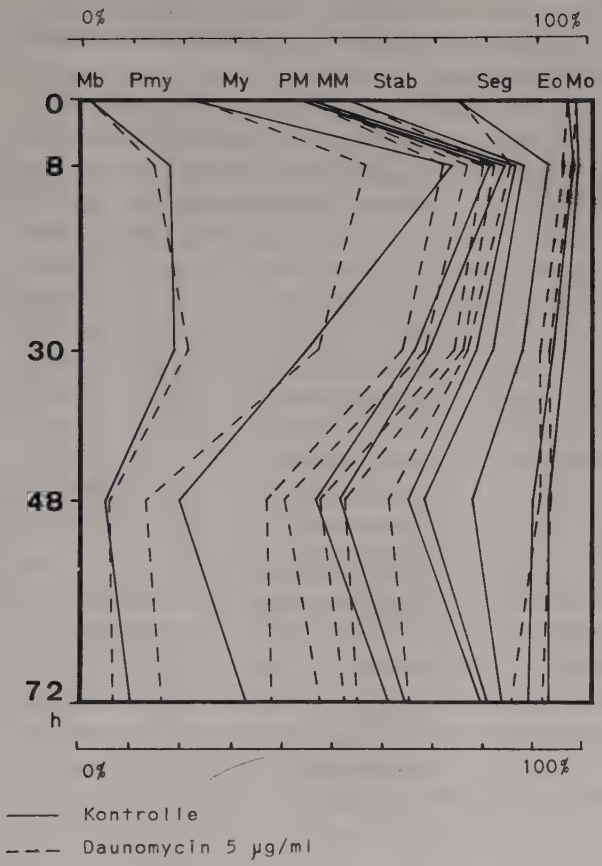


Abszisse: Prozentualer Anteil der einzelnen Reifungsstufen addierend aufgetragen.

Ordinate: Inkubationszeit der
Kontroll-Kulturen: 8, 3o, 48 und 72 Stunden
Zusatz-Kulturen : 8, 3o, 48 und 72 Stunden.

Zeichenerklärung siehe S. 10

Abbildung 4 (Patient A.G., Verdacht auf beginnende chronische Myelose)



Abszisse: Prozentualer Anteil der einzelnen Reifungsstufen, addierend aufgetragen.

Ordinate: Inkubationszeit der
Kontroll-Kulturen: 8, 3o, 48 und 72 Stunden,
Zusatz-Kulturen : 8, 3o, 48 und 72 Stunden.

Zeichenerklärung s. Seite 10

III. Patient K.F. – Alter: 72 Jahre

Die Patientin wurde am 27.11.1969 vom Krankenhaus Am Kreuzberg wegen einer akut aufgetretenen Leukose in das Neuköllner-Krankenhaus verlegt. Sie war im Krankenhaus Am Kreuzberg zunächst 14 Tage lang mit 100 mg/die Solu-Decortin H - mit anschließender ausschleichender Dosierung - und dann ca. 4 Wochen lang mit 3 x 50 mg/die 6-Mercaptopurin behandelt worden.

Klinischer Befund:	Leber 3 Querfinger unterhalb des Rippenbogens tastbar, Milz nicht tastbar. Petechien an Extremitäten und Stamm, zum Teil konfluierend.	
Blutbild am 1.12.69:	Erythrozyten	2,75 Mill/µl
	Hb	8,2 g%
	Leukozyten	8.700/µl
	Thrombozyten	3.000/µl
Differentialblutbild:	Myeloblasten	67%
	Promyelozyten	0%
	Myelozyten	0%
	stabkernige Granulozyten	0%
	segmentkernige Granulozyten	4%
	eosinophile Granulozyten	7%
	basophile Granulozyten	0%
	Monozyten	2%
	Lymphozyten	20%

Therapie eine Woche vor der Knochenmarkpunktion:

50 mg/die Prednisolon
1 g/die Ascorbinsäure
3 x 1 Tbl./die Ruticalcon^{R}
und Herzglycoside

Sternalpunktat vom 1.12.1969:

Es herrschen Blasten vor, die morphologisch an Myeloblasten denken lassen, allerdings durch ihr reichliches Zytoplasma atypisch sind. Die Blasten sind PAS-positiv und fast alle mehr oder weniger Peroxidase-negativ, haben aber sowohl im Peroxidasepräparat, als auch in der Lebendbeobachtung zum großen Teil Auer-Stäbchen. Reife granulopoetische Vorstufen treten kaum auf (5%). Der Mitoseindex der Blasten liegt bei 3,9 °/oo. Die Erythropoese ist normoblastisch, nicht vermindert und auch nicht wesentlich verschoben. Der rote Mitoseindex liegt mit 16,8 °/oo im Normbereich.

Diagnose: Myeloblasten-Leukämie

Reifungskurve der Erythropoese in vitro: Tab. 3, Abb. 5

Bei dieser Versuchsreihe setzten wir Daunomycin in zwei Konzentrationen zu (wirksame Konzentration 1 bzw. 5 µg/ml). Nach 11 Stunden sehen wir unter Daunomycin eine Linksverschiebung der Reifungskurven der Proerythroblasten und der basophilen Erythroblasten und eine Rechtsverschiebung der Reifungskurve der polychromatischen Erythroblasten. Die Ergebnisse der Kulturen mit 1 und 5 µg/ml Daunomycin differieren nur gering.

Bei den 19-Stunden-Kulturen fällt bei einer Konzentration von 1 µg/ml Daunomycin bei der Reifungskurve der Proerythroblasten und basophilen Erythroblasten eine Links- und bei einer Konzentration von 5 µg/ml Daunomycin eine Rechtsverschiebung auf. Die Reifungskurve der polychromatischen Erythroblasten ist unter Daunomycin rechtsverschoben und bei der höheren Konzentration stärker rechtsverschoben.
Der prozentuale Anteil der reifen Erythroblasten ist bei der Konzentration von 1 µg/ml Daunomycin annähernd gleich, bei einer von 5 µg/ml kleiner geworden.
Bei den 36-Stunden-Kulturen fällt eine Linksverschiebung aller Reifungskurven auf, die bei der höheren Daunomycinkonzentration ausgeprägter ist.

Reifungskurve der Granulopoese in vitro: Tab. 3, Abb. 6

Der hohe prozentuale Anteil der Myeloblasten ändert sich auch unter Daunomycinzusatz nicht wesentlich, die Reifungshemmung bleibt auch nach 36 Stunden noch bestehen.

G/E-Indices: Tab. 8, S. 51

Die G/E-Indices sind unter Daunomycin alle deutlich erniedrigt, wobei Daunomycin in einer Konzentration von 1 µg/ml den G/E-Index etwas mehr senkte als in einer von 5 µg/ml.

Mitosen: Tab. 9, S. 53

Der weiße Mitoseindex der Kulturen mit Daunomycin differiert nicht wesentlich von den Kontrollkulturen. Der rote Mitoseindex ist unter Daunomycin jedesmal erniedrigt.

Tabelle 3
(Pat. K.F., Kultur III)

Prozentuale Zellverteilung in der Erythropoese

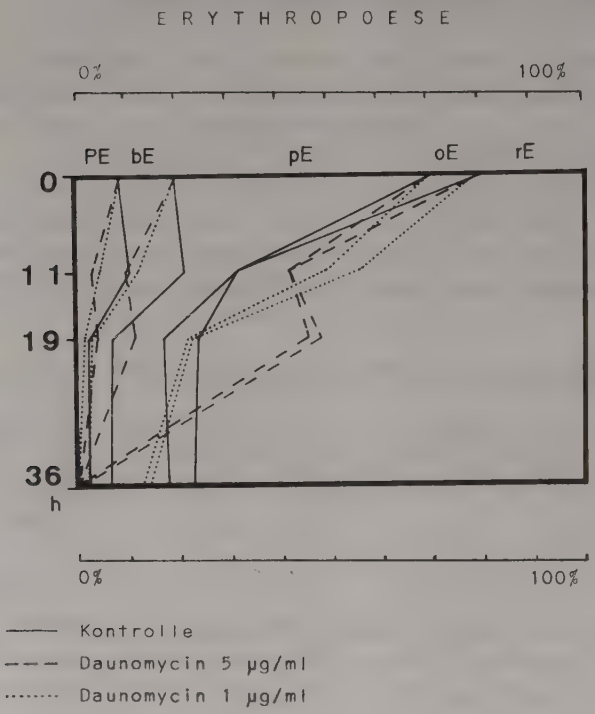
	11 h			19 h			36 h		
	K(%)	z(%)	Z(%)	K(%)	z(%)	Z(%)	K(%)	z(%)	Z(%)
PE	10,7	4,5	3,2	2,3	1,1	4,0	2,1	0,7	-
bE	10,5	7,6	6,6	4,7	1,9	7,5	4,2	1,1	-
pE	11,0	37,6	32,1	10,2	18,7	34,1	11,5	11,0	-
oE	-	6,3	-	6,6	1,2	2,3	5,2	1,3	1,6
rE	67,8	44,0	58,1	76,2	77,1	52,1	77,0	85,9	98,4
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Prozentuale Zellverteilung in der Granulopoese

	11 h			19 h			36 h		
	K(%)	z(%)	Z(%)	K(%)	z(%)	Z(%)	K(%)	z(%)	Z(%)
Mb	94,7	97,9	98,6	98,8	96,6	97,2	97,1	94,9	98,5
Pmy	0,6	0,3	0,1	0,1	0,4	1,0	1,3	0,7	1,0
My	0,2	0,1	0,1	-	0,1	0,1	-	0,7	-
Eo	-	0,5	0,2	-	0,7	0,5	0,2	1,2	-
Ba	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PM	3,5	0,2	0,1	0,5	-	0,2	1,3	0,9	-
MM	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-
Stab	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-
Seg	-	0,1	0,1	-	-	0,2	-	0,1	-
Eo	-	0,7	0,7	0,3	2,1	0,7	-	1,3	0,5
Ba	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-
Mo	0,6	0,1	-	0,3	0,1	0,1	0,1	-	-
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

K = Kulturen ohne Daunomycinzusatz
z = Kulturen mit einer Daunomycinkonzentration von 1 µg/ml
Z = Kulturen mit einer Daunomycinkonzentration von 5 µg/ml

Abbildung 5 (Patient K.F., Myeloblasten-Leukämie)

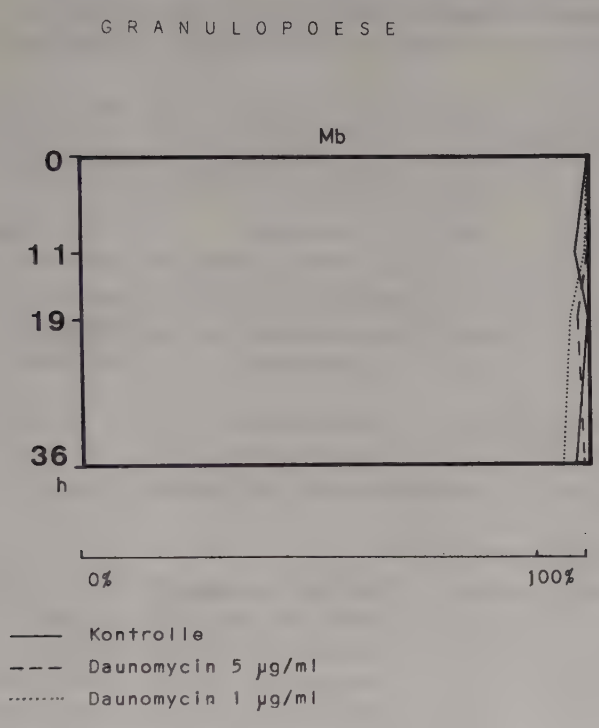


Abszisse: Prozentualer Anteil der einzelnen Reifungsstufen, addierend aufgetragen.

Ordinate: Inkubationszeit der
Kontroll-Kulturen: 11, 19 und 36 Stunden
Zusatz-Kulturen : 11, 19 und 36 Stunden

Zeichenerklärung siehe S. 10

Abbildung 6 (Patient K.F., Myeloblasten-Leukämie)



Abszisse: Prozentualer Anteil der einzelnen Reifungsstufen, addierend aufgetragen.

Ordinate: Inkubationszeit der
Kontroll-Kulturen: 11, 19 und 36 Stunden
Zusatz-Kulturen : 11, 19 und 36 Stunden.

Zeichenerklärung siehe S. 10

IV. Patient M.K. Alter: 66 Jahre

Der Patient, der anamnestisch starkes Zahnfleischbluten seit drei Wochen angab, wurde am 18.6.1969 wegen des Verdachtes auf eine akute Leukose stationär aufgenommen.

Klinischer Befund:	Leber nicht tastbar Milz 4 Querfinger verbreitert.	
Blutbild vom 18.6.69:	Erythrozyten	3,53 Mill/µl
	Hb	1o,6 g%
	HbE:	3o,1 pg
	Leukozyten	98.000/µl
	Thrombozyten:	106.000/µl
Differentialblutbild:	1oo% Blasten	

Therapie vor der Knochenmarkpunktion: keine

Sternalpunktat vom 18.6.69:

Die Granulopoese ist stark reduziert und nicht mehr zu beurteilen. Kleinere und größere Blasten, die PAS-negativ und Peroxydase-positiv sind, beherrschen das Bild. Der Mitoseindex der Blasten liegt bei 5,4 °/oo. Die Erythropoese ist vermindert, normoblastisch und nicht wesentlich verschoben. Der rote Mitoseindex ist mit 8,7 °/oo erniedrigt.

Diagnose: Myeloblastenleukämie

Dieser Kultur wurde Daunomycin in einer wirksamen Konzentration von 10 µg/ml zugesetzt. Bei dieser Stärke sind die Zellen der 48-Stunden-ausstriche nicht mehr differenzierbar, die Dosis erweist sich bereits als toxisch.

Reifungskurve der Erythropoese in vitro: Abb. 7, Tab. 4

Wir sehen nach 24 Stunden eine deutliche Links-verschiebung der Reifungskurven unter Daunomycin.

Reifungskurve der Granulopoese in vitro: Abb. 8, Tab. 4

Nach 24 Stunden besteht keine wesentliche Verschiebung der Reifungskurve nach Daunomycinzusatz.

G/E-Indices: Tab. 8, S.51

Nach 24 Stunden unter Daunomycin ist der G/E-Index deutlich erniedrigt.

Mitosen: Tab. 9, S. 53

Der weiße Mitoseindex ist nach 24 Stunden unter Daunomycin erniedrigt, der rote Mitoseindex gering erhöht.

Tabelle 4

(Pat. M.K., Kultur IV)

Prozentuale Zellverteilung in der Erythropoese

	24 h	
	K(%)	Z(%)
PE	3,4	0,7
bE	11,9	3,2
pE	54,2	50,0
oE	-	5,0
rE	30,5	41,1
	100,0	100,0

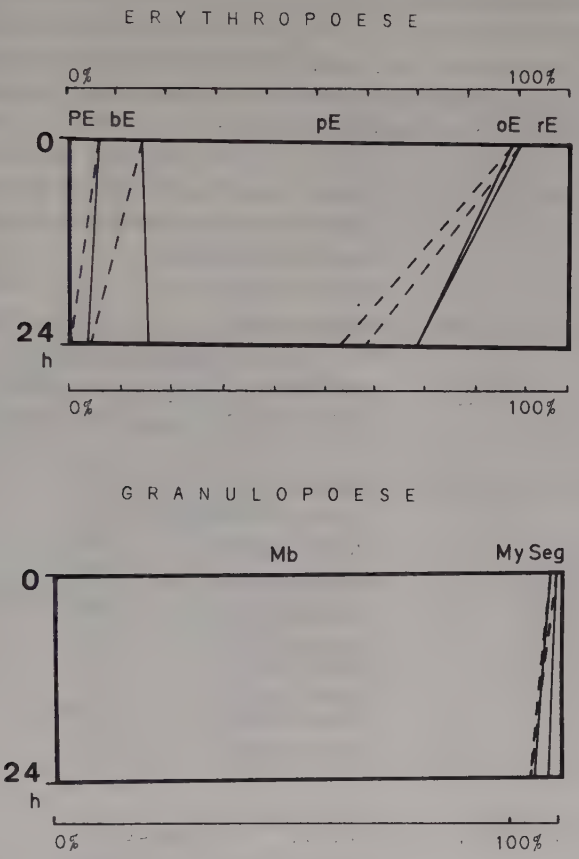
Prozentuale Zellverteilung in der Granulopoese

	24 h	
	K(%)	Z(%)
Mb	94,6	93,7
Pmy	0,6	-
My	0,8	-
Eo	-	-
Ba	-	-
PM	1,2	-
MM	0,2	0,6
Stab	1,3	0,9
Seg	1,3	4,3
Eo	-	-
Ba	-	-
Mo	-	0,5
	100,0	100,0

K = Kulturen ohne Daunomycinzusatz

Z = Kulturen mit einer Daunomycinkonzentration von 10 µg/ml

Abbildung 7 u. 8 (Patient M.K., Myeloblasten-Leukämie)



Abszisse: Prozentualer Anteil der einzelnen Reifungsstufen, addierend aufgetragen.

Ordinate: Inkubationszeit der
Kontroll-Kulturen: 24 Stunden,
Zusatz-Kulturen : 24 Stunden.

Zeichenerklärung siehe S. 10

V. Patient I.K. Alter: 41 Jahre

Am 15.11.1969 wurde die Patientin wegen einer "fieberhaften Gastroenteritis bei chronisch myeloischer Leukämie" stationär aufgenommen. Die chronisch myeloische Leukämie war seit zwei Jahren bekannt und mit wöchentlichen Dosen von 6 - 8 mg Busulfan behandelt worden.

Klinischer Befund:	Leber 1 Querfinger verbreitert, Milz 3 - 4 Querfinger unterhalb des Nabels tastbar	
Blutbild vom 21.11.69:	Erythrozyten	3,3 Mill/µl
	Hb	9,3 g%
	Leukozyten	16.700/µl
	Thrombozyten	48.000/µl
Differentialblutbild:	Myeloblasten	3%
	Mikro-Myeloblasten	1%
	Promyelozyten	7%
	Myelozyten	5%
	Metamyelozyten	5%
	stabkernige Granulozyten	21%
	segmentkernige Granulozyten	57%
	Lymphozyten	1%

Therapie vor der Knochenmarkpunktion:

Valium(R), 1o mg/die
Gentamycin, 2 x 1 Ampulle/die
Bepanthen(R), 3 x 1 Tablette/die
Mexaform(R), 3 x 2 Tabletten/die
Ascorbinsäure, 1 g/die

Sternalpunktat vom 2o.11.1969:

Vermehrte und linksverschobene Granulopoese, am auffälligsten sind Myeloblasten und Promyelozyten vermehrt. Der weiße Mitoseindex liegt mit 13,4 o/oo im Bereich der Norm. Die Peroxydasereaktion ist sehr gut positiv. Die Erythropoese ist vermindert und stark linksverschoben. Es fällt der hohe Anteil von Erythroblasten auf, von denen ein Teil in Folge ihrer Größe, Kernstrukturierung und Kern-Plasmarelation sowie ihrer grobgranulär positiven PAS-Reaktion als atypisch zu bezeichnen sind (Abb a+b).

Die Berliner-Blau-Reaktion zeigt eine reichliche Fe-Speicherung im Retikulum.
Der rote Mitoseindex ist mit 10,9 °/oo leicht erniedrigt. Megakaryozyten kommen reichlich und in allen Reifungsstufen vor, der Anteil der Retikulumzellen liegt mit 27 °/oo im oberen Normbereich.

Diagnose: Erythro-Myeloblastenschub einer chronisch myeloischen Leukämie.

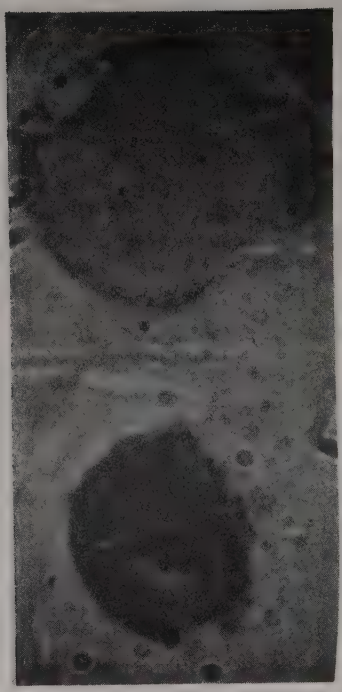


Abb. a: atypischer Proerythroblast oben und zweikerniger polychromatischer Erythroblast unten. 1.000-fach vergrößert Originalausstrich PAS-Färbung

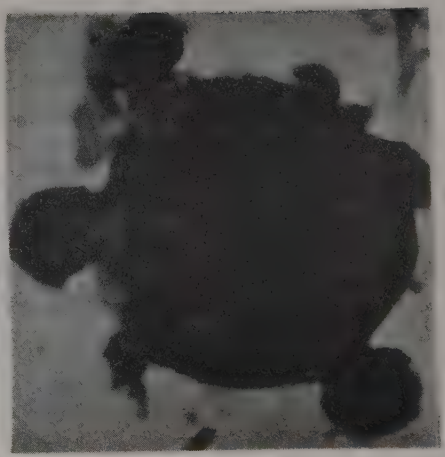


Abb. b: 1.000-fach vergrößerter atypischer Proerythroblast, 48-Stundenausstrich der Kontrollkultur. Pappenheimfärbung.

Reifungskurve der Erythropoese in vitro: Abb. 9, Tab. 5

Nach 24 Stunden sehen wir bei der Kultur mit 1 µg/ml Daunomycin eine Abnahme der Proerythroblasten und Zunahme der reifen Erythroblasten, bei der mit 5 µg/ml Daunomycin eine ausgeprägte Abnahme der Proerythroblasten und deutliche Zunahme der polychromatischen Erythroblasten gegen die Kontrollkultur.

Nach 48 Stunden bestehen nur noch geringe Unterschiede zwischen den Reifungskurven der Kulturen mit und ohne Daunomycin. Der Anteil der Proerythroblasten in der Kontrollkultur ist in bezug auf den 24 Stundenausstrich konstant geblieben. Abb. b zeigt einen atypischen Proerythroblasten in 1.000-facher Vergrößerung.

Nach 96 Stunden besteht die Erythropoese - wie auch schon nach 48 Stunden - fast ausschließlich aus Proerythroblasten und reifen Erythroblasten. Auffällig aber ist ein relativer Rückgang der Proerythroblasten unter Daunomycin gegen die Kontrollkultur.

Reifungskurve der Granulopoese in vitro: Abb. 1o und 11, Tab. 5

Nach 24 Stunden sehen wir unter 1 µg/ml und 5 µg/ml Daunomycin eine prozentuale Abnahme der Myeloblasten zu Gunsten der Myelozyten.

Nach 48 Stunden fällt bei den Kulturen mit 1 µg/ml und 5 µg/ml Daunomycin eine Abnahme der Promyelozyten und eine prozentuale Zunahme der Myelozyten in bezug auf die Kontrollkultur auf.

Nach 96 Stunden sehen wir bei den Kulturen mit 1 µg/ml und 5 µg/ml Daunomycinzusatz eine relative Abnahme

der Myeloblasten, eine relative Zunahme der Myelozyten und eine starke relative Zunahme der segmentkernigen Granulozyten:

Der Anteil der stab- und segmentkernigen Granulozyten an der Granulopoese beträgt unter 1 µg/ml Daunomycin 32,9%, unter 5 µg/ml 30,4 % und bei der Kontrollkultur nur 1,5%!

Diese unterschiedliche Zellverteilung der Kontroll- und Zusatzkultur nach 96 Stunden ist hochsignifikant ($p < 0,001$).

G/E-Indices: Tab. 8, S. 51

Nach 24 Stunden ist der G/E-Index nach Zusatz von 1 µg/ml Daunomycin unverändert, nach Zusatz von 5 µg/ml leicht erniedrigt.
Nach 48 Stunden ist der G/E-Index bei den Kulturen mit Daunomycinzusatz deutlich erniedrigt.
Nach 96 Stunden ist der G/E-Index bei den Zusatzkulturen wieder soweit angestiegen, daß er knapp über dem der Kontrollkultur liegt.

Mitosen: Tab. 9, S. 53

Der weiße Mitoseindex ist nach 24 Stunden unter Daunomycin erniedrigt, nach 48 und 96 Stunden aber gleich dem der Kontrollkultur.
Der rote Mitoseindex ist gleichfalls nach 24 Stunden unter Daunomycin vermindert, nach 48 und 96 Stunden sahen wir keine Mitosen in der Zusatz- und in der Kontrollkultur mehr.

Tabelle 5

(Pat. I.K., Kultur V)

Prozentuale Zellverteilung in der Erythropoese

	24 h			48 h			96 h		
	K(%)	z(%)	Z(%)	K(%)	z(%)	Z(%)	K(%)	z(%)	Z(%)
PE	62,8	49,6	29,1	61,5	48,8	58,0	75,2	61,4	55,0
bE	1,6	1,1	8,4	-	1,4	-	1,9	0,6	-
pE	3,2	6,4	27,6	-	3,1	2,0	2,9	1,1	-
oE	-	-	1,3	-	-	-	-	-	-
rE	32,4	42,9	33,6	38,5	46,7	40,0	20,0	36,9	45,0
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Prozentuale Zellverteilung in der Granulopoese

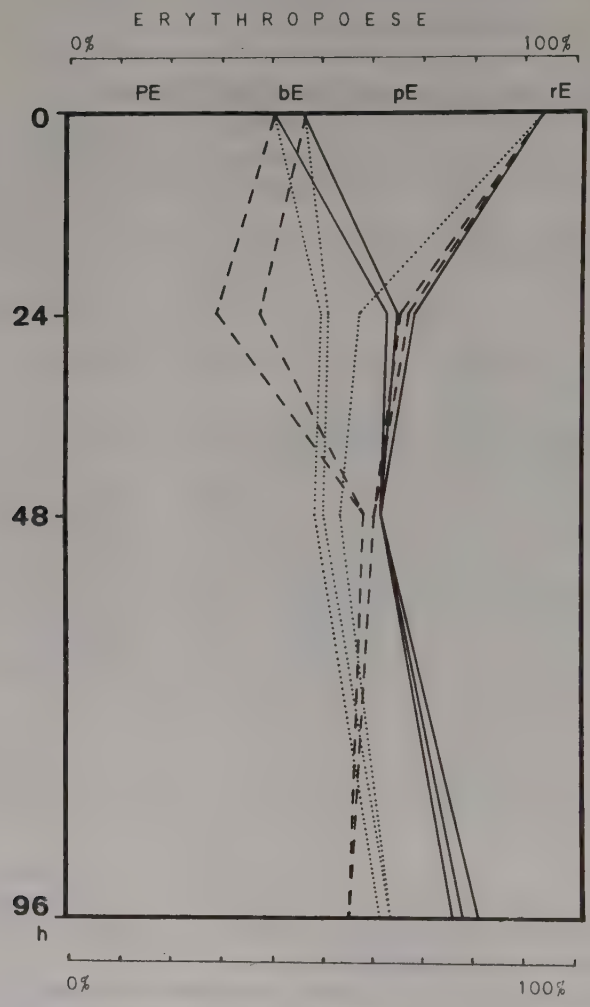
	24 h			48 h			96 h		
	K(%)	z(%)	Z(%)	K(%)	z(%)	Z(%)	K(%)	z(%)	Z(%)
Mb	20,6	6,7	7,5	7,4	3,5	13,7	12,8	1,6	1,5
Pmy	38,7	29,8	30,7	34,4	23,4	18,8	35,7	4,4	0,6
My	18,4	25,6	23,0	28,5	30,8	36,3	19,7	26,2	26,0
Eo	15,0	15,6	13,0	13,3	21,9	15,0	22,2	30,9	37,1
Ba	-	-	-	1,8	-	1,7	1,8	-	-
PM	1,5	10,4	11,7	3,0	9,3	2,6	6,0	1,3	0,6
MM	1,6	2,9	3,3	1,0	2,6	2,6	-	2,3	3,8
Stab	1,4	2,1	1,8	3,0	2,7	4,0	-	4,8	5,1
Seg	1,3	2,9	3,5	4,6	2,6	4,3	-	17,4	14,0
Eo	1,5	4,0	5,5	3,0	3,2	1,0	1,5	10,7	11,3
Ba	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mo	-	-	-	-	-	-	0,3	0,4	-
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

K = Kulturen ohne Daunomycinzusatz

z = Kulturen mit einer Daunomycinkonzentration von 1 µg/ml

Z = Kulturen mit einer Daunomycinkonzentration von 5 µg/ml

Abbildung 9 (Patient I.K., Erythro-Myeloblastenschub einer chronisch myeloischen Leukämie)



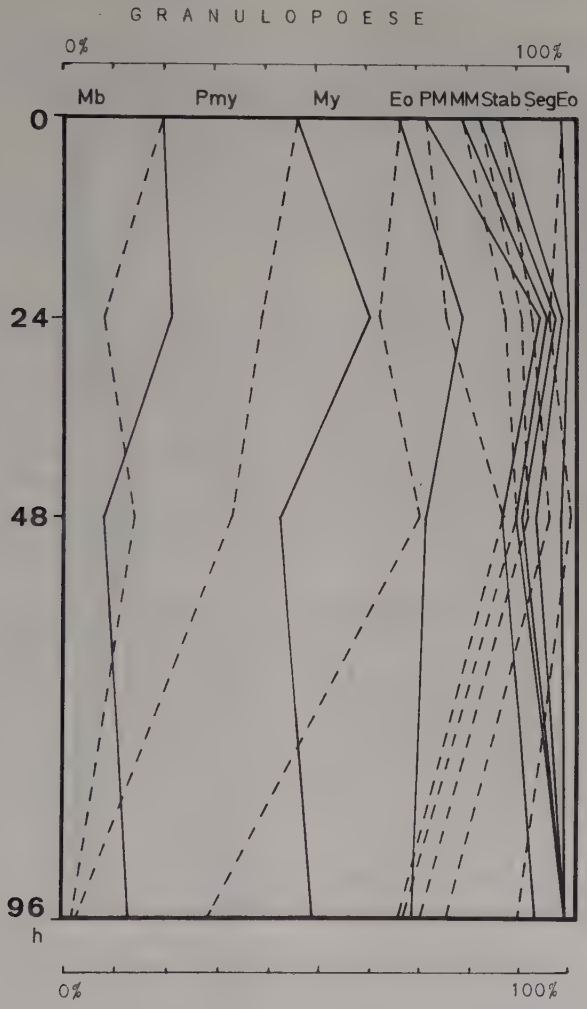
——— Kontrolle
– – – Daunomycin 5 µg/ml
····· Daunomycin 1 µg/ml

Abszisse: Prozentualer Anteil der einzelnen Reifungsstufen, addierend aufgetragen.

Ordinate: Inkubationszeit der Kontroll- und Zusatzkulturen, 24, 48 und 96 Stunden

Zeichenerklärung s. S. 10

Abbildung 10 (Patient I.K., Erythro-Myeloblastenschub einer chronisch myeloischen Leukämie)

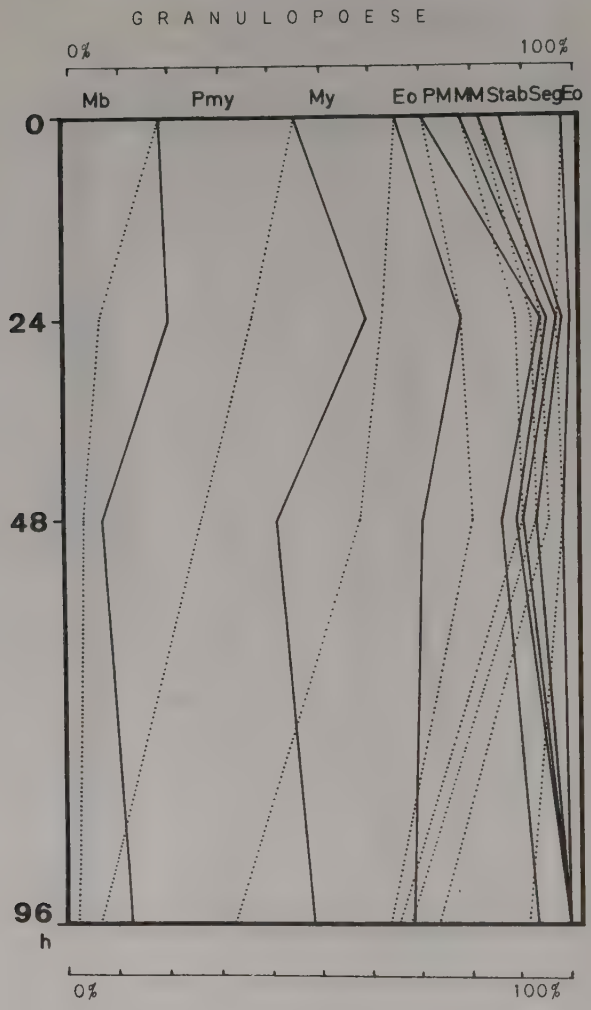


Abszisse: Prozentualer Anteil der einzelnen Reifungsstufen, addierend aufgetragen.

Ordinate: Inkubationszeit der Kontroll- und Zusatz-Kulturen: 24, 48 und 96 Stunden

Zeichenerklärung s. S. 10

Abbildung 11 (Patient I.K., Erythro-Myeloblastenschub einer chronisch myeloischen Leukämie)



—— Kontrolle
····· Daunomycin 1 µg/ml

Abszisse: Prozentualer Anteil der einzelnen Reifungsstufen, addierend aufgetragen.

Ordinate: Inkubationszeit der Kontroll- und Zusatz-Kulturen: 24, 48 und 96 Stunden

Zeichenerklärung s. S. 10

Zusammenstellung der Ergebnisse

Daunomycin in einer Stärke von 10 µg/ml wurde nur bei einem Versuch (IV) verwandt, da es in dieser Konzentration zu toxisch für die Kultur war. 1 µg/ml Daunomycin wurde zwei Kulturen zugesetzt. Da der weiße Mitoseindex nur gering oder gar nicht bei dieser Konzentration abfiel, wurden die weiteren Versuche mit 5 µg/ml Daunomycin angesetzt (I, II, III, V).

Übereinstimmend mit den Untersuchungen in vivo (44) und in vitro (14, 2o, 35, 43) fanden wir die folgenden zellmorphologischen Veränderungen unter Daunomycin:

> Megaloblastische Transformation der roten Reihe, vermehrte cytoplasmatische Vakuolisierung, Kernanomalien wie "Gänseblümchenkerne", Kernauszieh ungen und -absprengungen und vermehrt anfallender Zelldetritus.

1. Mittlere Reifungskurve der Erythropoese (mit Zusatz von 5 µg/ml): Abb. 12, Tab. 6

Es wurden die vorliegenden Werte der Kulturen I-III gemittelt, die Kultur V wurde nicht miteinbezogen, da ihre erythrämische Erythropoese eine von den übrigen Kulturen stark abweichende Proliferationskinetik zeigt.
Kultur IV wurde nur mit Daunomycin in einer Konzentration von 1o µg/ml angesetzt.
Nach 8-11 Stunden fällt eine Abnahme der Proerythroblastenzahl und relative Zunahme der reifen Erythroblasten unter Daunomycin auf.
Nach 19-3o Stunden sehen wir keine deutlichen Unterschiede zwischen den Kulturen mit und ohne Zusatz von Daunomycin.

Nach 36 - 48 Stunden hingegen fällt eine starke allgemeine Linksverschiebung der Reifungskurve unter Daunomycin auf. Nach 72 Stunden ist die Zusammensetzung der Erythropoese der Kulturen mit und ohne Zusatz des Zytostatikums wieder weitgehend identisch.

2. Mittlere Reifungskurve der Granulopoese (mit Zusatz von 5 µg/ml Daunomycin): Abb. 13, Tab. 7

Auch hier wurden nur die Werte der Kulturen I, II und V gemittelt, da die Proliferationskinetik der Granulopoese der Kulturen III und IV (Kulturen von akuten Leukämien) von diesen zu stark differiert.
Nach 24-30 Stunden Einwirkzeit von Daunomycin ist eine relative Abnahme der Myeloblasten zu Gunsten der Myelozyten zu erkennen.
Nach 48-stündiger Einwirkzeit des Zytostatikums sehen wir - im Gegensatz zu den Kontrollkulturen - eine relative Abnahme der Promyelozyten und relative Vermehrung der Myelozyten und der segmentkernigen Granulozyten.
Nach 72 - 96 Stunden finden wir bei den Kulturen mit Daunomycin eine deutliche relative Abnahme der Myeloblasten und Promyelozyten und eine ebenso deutliche Zunahme der stabkernigen und segmentkernigen Granulozyten.

T a b e l l e 6

(arithmetische Mittelwerte der Patienten H.N., A.G., K.F.)

Prozentuale Zellverteilung in der Erythropoese

	8-11 h		19-30 h		36-48 h		72 h	
	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)
PE	8,5	3,6	1,9	3,7	1,0	0,3	-	-
bE	8,4	6,2	3,7	5,6	4,7	0,7	0,8	1,8
pE	36,2	34,7	31,4	37,2	24,0	6,2	3,5	5,7
oE	-	2,0	4,6	7,5	4,6	5,2	1,3	2,8
rE	46,9	53,5	58,4	46,0	65,7	87,6	94,4	89,7
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

T a b e l l e 7

(arithmetische Mittelwerte der Patienten H.N., A.G., I.K.)

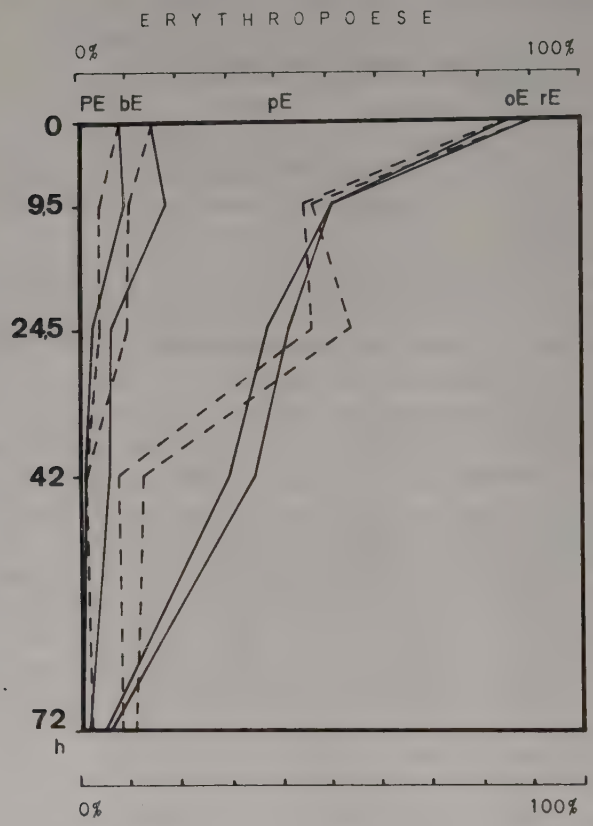
Prozentuale Zellverteilung in der Granulopoese

	24-3o h		48 h		72-96 h	
	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)	K(%)	Z(%)
Mb	14,5	10,9	5,9	6,3	8,1	3,0
Pmy	27,5	28,1	24,6	10,4	22,9	8,7
My	24,2	32,3	37,6	45,2	45,0	40,4
Eo	-	-	-	-	-	-
PM	4,2	6,7	8,0	3,3	7,1	2,5
MM	3,7	3,6	2,1	6,4	2,4	3,9
Stab	4,1	1,7	6,2	5,5	1,5	8,6
Seg	18,5	13,0	11,4	20,0	9,0	27,9
Eo	-	-	-	-	-	-
Mo	3,1	3,7	4,2	2,9	4,0	5,0
	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

K = Kulturen ohne Daunomycinzusatz

Z = Kulturen mit einer Daunomycinkonzentration von 5 µg/ml

Abbildung 12 (Mittelwerte der Patienten H.N., A.G. und K.F.)

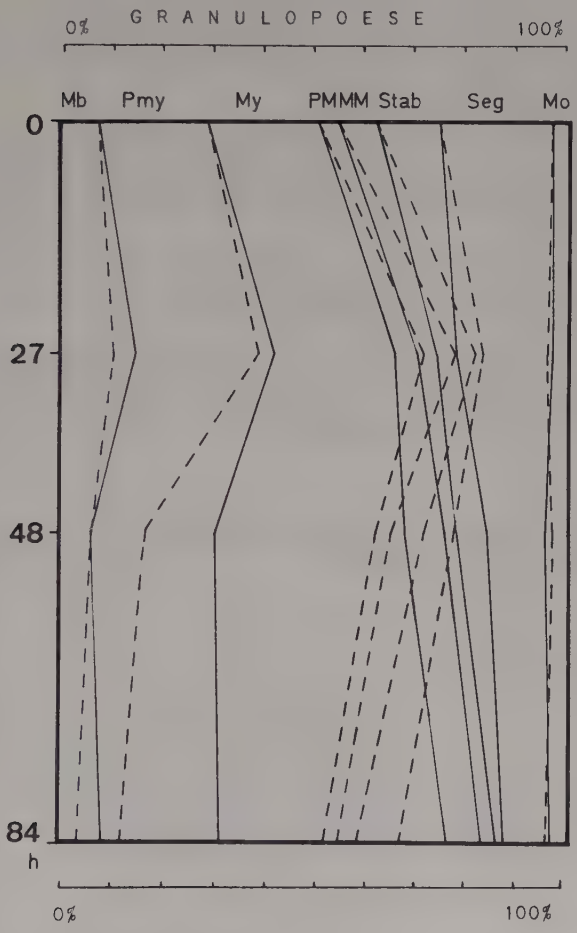


Abszisse: Prozentualer Anteil der einzelnen Reifungsstufen, addierend aufgetragen.

Ordinate: Gemittelte Inkubationszeit der
Kontroll-Kulturen: 9,5, 24,5, 42 und 72 Stunden
Zusatz-Kulturen : 9,5, 24,5, 42 und 72 Stunden

Zeichenerklärung siehe S. 10

Abbildung 13 (Mittelwerte der Patienten H.N., A.G. und I.K.)



Abszisse: Prozentualer Anteil der einzelnen Reifungsstufen, addierend aufgetragen.

Ordinate: Gemittelte Inkubationszeit der
Kontroll-Kulturen: 27, 48 und 84 Stunden
Zusatz-Kulturen : 27, 48 und 84 Stunden

Zeichenerklärung siehe S. 10

3. G/E-Indices: Tab. 8, S. 51

Wir faßten die G/E-Indices der Kulturen I+II zusammen und die der Kulturen III+IV, da sich diese Kulturen weitgehend in der Proliferationskinetik der Erythropoese und Granulopoese gleichen.

Wir sehen, daß sich der gemittelte G/E-Index der Kulturen I und II nach 24 - 3o Stunden unter Daunomycin nur geringfügig von dem der Kontrollkulturen unterscheidet.

Nach 72 Stunden liegt der gemittelte G/E-Index der Kulturen mit Daunomycin deutlich unter dem der Kontrollkulturen.
Der gemittelte G/E-Index der Kulturen III und IV liegt unter Daunomycin schon nach 19 - 24 Stunden stark unter dem der Kontrollkulturen.

4. Arithmetisch gemittelte Mitoseindices der Kulturen I, II, III und V: Abb. 14,15, Tab. 9 S. 53

Wir mittelten hier die Mitoseindices aller Kulturen mit Zusatz von Daunomycin in einer Endkonzentration von 5 µg/ml und die der entsprechenden Kontrollkulturen, um bei dem spärlichen Zahlenmaterial eine zusammenfassende Aussage machen zu können. Daß dies wegen der Heterogenität des Ausgangsmaterials (akute und chronische Leukämie-Kulturen) nicht problemlos ist und diese Mittelwerte nur mit Vorbehalt betrachtet werden dürfen, ist uns bewußt.

T a b e l l e 8

G/E-Indices

	0 h	8 h		24-30 h		48 h		72 h	
	K	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z
Versuch I	10,9			8,6	6,5	-	2,6	6,1	2,5
Versuch II	7,2	17,2	6,2	6,1	9,3	4,4	8,1	11,0	3,0
arith.Mi.	9,0			7,4	7,9		5,4	8,6	2,8

	0 h	11 h			19-24 h			36 h		
	K	K	z	Z	K	z	Z	K	z	Z
VersuchIII	3,4	4,1	1,8	3,3	5,8	2,4	2,6	19,0	1,3	1,5
Versuch IV	16,2				7,0		2,4*			
arith.Mi.	9,8				6,4					

	0 h	24 h			48 h			96 h		
	K	K	z	Z	K	z	Z	K	z	Z
Versuch V	5,3	5,1	5,2	3,1	9,8	2,6	2,7	7,7	9,6	10,3

arith.Mi=arithmetischer Mittelwert
K =Kulturen ohne Daunomycinzusatz
z =Kulturen mit einer Daunomycinkonzentration v.1µg/ml
Z =Kulturen mit einer Daunomycinkonzentration v.5µg/ml
* =Kultur mit einer Daunomycinkonzentration v.10µg/ml

Versuch I wurde mit einem Sternalmarkpunktat des Pat. H.N.
Versuch II mit dem des Pat. A.G.,
Versuch III mit dem des Pat. K.F.,
Versuch IV mit dem des Pat. M.K.,
Versuch V mit dem des Pat. I.K. gemacht.

Bei den Kontrollkulturen bleibt der gemittelte rMI nach 8 - 11 Stunden annähernd konstant, der gemittelte wMI steigt an. Unter 5 µg/ml Daunomycin finden wir nach 8 - 11 Stunden ein deutliches Absinken des gemittelten rMI und einen nicht ganz so starken Abfall des mittleren wMI.

Nach 19 - 30 Stunden sehen wir ein Absinken der mittleren rMI und wMI, das durch Daunomycin noch verstärkt wird.

Nach 36 - 48 Stunden ist der gemittelte rMI der Kontrollkulturen relativ konstant geblieben, der der Kulturen mit 5 µg/ml Daunomycin hingegen ist auf 0 abgesunken. Der mittlere wMI der Kontrollkulturen ist weiter abgesunken, der mittlere wMI unter 5 µg/ml Daunomycin ist annähernd konstant geblieben, liegt aber weiterhin deutlich unter dem der Kontrollkulturen.

Nach 72 - 96 Stunden sind keine Mitosen weder der roten noch der weißen Reihe von uns festgestellt worden.

Tabelle 9

Mitoseindices (in °/oo)

ERYTHROPOESE

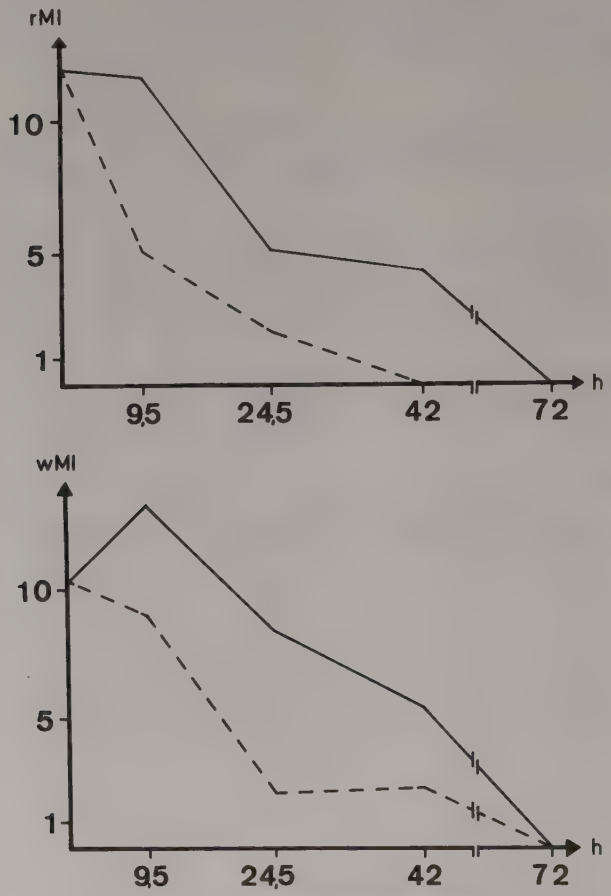
	0 h	8-11 h			19-30 h			36-48 h		
	K	K	z	Z	K	z	Z	K	z	Z
Versuch I	6,5				0,0		0,0			0,0
Versuch II	13,8	0,0		0,0	0,0		0,0	13,0		0,0
Versuch III	16,8	23,3	13,1	10,2	15,4	0,0	7,5	0,0	0,0	0,0
Versuch V	10,9				4,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
arith.Mi.	12,0	11,7		5,1	5,1	0,0	1,9	4,3	0,0	0,0
Versuch IV	8,7				0,0		3,1*			

GRANULOPOESE

	0 h	8-11 h			19-30 h			36-48 h		
	K	K	z	Z	K	z	Z	K	z	Z
Versuch I	8,7				3,8		0,0			0,0
Versuch II	15,1	20,3		14,6	18,5		1,7	11,2		1,2
Versuch III	3,9	6,3	8,4	3,3	2,5	3,0	3,6	0,6	0,9	0,0
Versuch V	13,4				8,5	4,8	2,9	4,5	5,3	5,8
arith.Mi.	10,3	13,3		9,0	8,3	3,9	2,1	5,4	3,1	2,3
Versuch IV	5,4				5,9		1,6*			

Arith.Mi.=arithmetischer Mittelwert
K =Kulturen ohne Daunomycinzusatz
z =Kulturen mit einer Daunomycinkonzentration v.1µg/ml
Z =Kulturen mit einer Daunomycinkonzentration v.5µg/ml
* =Kultur mit einer Daunomycinkonzentration v.10µg/ml

A b b i l d u n g e n 14 und 15
(mittlerer, roter und weißer Mitoseindex der
Versuche I, II, III und V)



——— Kontrolle
– – – Daunomycin 5 µg/ml

Abszisse: Inkubationszeit der Kulturen in Stunden
Ordinate: roter Mitoseindex (rMI) (Abb. 14) und
weißer Mitoseindex (wMI) (Abb. 15) in °/oo

5. Karyologische Kurve der arithmetisch gemittelten Fälle I - V: Abb. 16, Tab. 10

Die karyologischen Kurven der Granulopoese mit und ohne Daunomycin decken sich im wesentlichen.*
Wegen der geringen absoluten Mitosezahlen in der Erythropoese - noch dazu fast nur Prophasen - wurde für diese keine karyologische Kurve erstellt.

6. Wirkung von Daunomycin in Abhängigkeit von seiner Konzentration

In Versuch III wirken 1 µg/ml Daunomycin bei 11 und 36 Stunden schwächer (im Sinne einer geringen Linksverschiebung der Reifungskurven) auf die Reifung der Erythropoese, in Versuch V nur vorübergehend bei 24 Stunden.
Die Reifung der Granulopoese der Kulturen III und V zeigt keine Abhängigkeit von der Daunomycindosis, wenn man von einem erhöhten Myeloblastenanteil der Kultur V nach 48 Stunden absieht.
Der G/E-Index liegt bei einer Daunomycinkonzentration von 1 µg/ml in Versuch III bei 11 Stunden niedriger und in Versuch V bei 24 Stunden höher als der G/E-Index bei der höheren Dosis.
Die stärkere Verminderung des roten und weißen Mitoseindex unter 5 µg/ml Daunomycin tritt nur vorübergehend - bei Kultur III nach 11 und bei Kultur V nach 24 Stunden - in Erscheinung.

*Auch hierfür gilt die Einschränkung, die für die Aussagekraft der gemittelten Mitoseindices gemacht wurde (s. S. 50).

Tabelle 10

Absolute und prozentuale Häufigkeit der Mitosephasen

ERYTHROPOESE
(8 - 96 h)

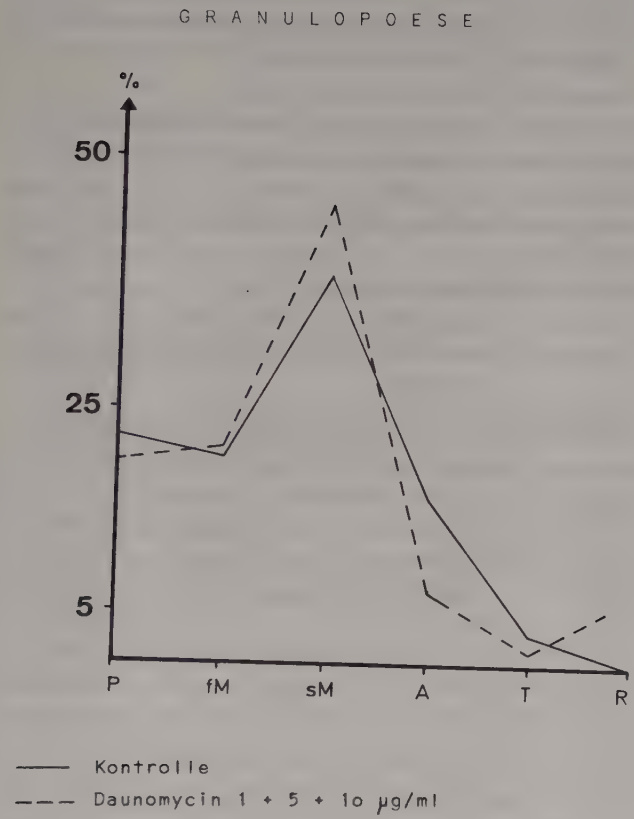
	K	Z
Prophase	5	8
frühe Metaphase	1	1
späte Metaphase	1	
Anaphase		
Telophase		
Rekonstruktionsphase		1
	7	10

GRANULOPOESE
(8 - 96 h)

	K		Z	
Prophase	22	22,2%	14	19,7%
frühe Metaphase	20	20,2%	15	21,2%
späte Metaphase	38	38,4%	32	45,1%
Anaphase	16	16,2%	5	7,0%
Telophase	3	3,0%	1	1,4%
Rekonstruktionsphase	0	0 %	4	5,6%
	99	100,0%	71	100,0%

K = Kulturen ohne Daunomycinzusatz
Z = Kulturen mit einer Daunomycinkonzentration von 1, 5 und 10 µg/ml

Abb. 16 (prozentuale Mitosephasenverteilung)



Abszisse: Mitosephasen
Ordinate: prozentuale Mitosezahl

7. Signifikanzberechnung

7.1. Berechnung der Signifikanz auf abweichende Zellverteilung der Granulopoese zwischen Kontroll- und Zusatz-Kulturen:

7.1.1. 72-Stunden-Kulturen des Versuches I
Pat. H.N.: $p < 0{,}001$ (i.e. hochsignifikant)

7.1.2. 72-Stunden-Kulturen des Versuches II
Pat. A.G.: $p < 0{,}001$

7.1.3. 96-Stunden-Kulturen des Versuches V
Pat. I.K.:

7.1.3.1. Daunomycinkonzentration von 1 µg/ml:
$p < 0{,}001$

7.1.3.2. Daunomycinkonzentration von 5 µg/ml:
$p < 0{,}001$

7.2.* Berechnung der Signifikanz auf abweichende Mitosen zwischen Kontroll- und Zusatz-Kulturen:

7.2.1 Daunomycinkonzentration von 1 µg/ml:
$p > 0{,}05$ (i.e. nicht signifikant)

7.2.2. Daunomycinkonzentration von 5 µg/ml:
$p < 0{,}01$ (i.e. signifikant)

*Auch hier gilt die Einschränkung, die für die Aussagekraft der gemittelten Mitoseindices gemacht wurde (s. S. 50).

Diskussion

Das Ziel dieser Untersuchungen war es, den Effekt von Daunomycin auf die Proliferation von Knochenmark leukämiekranker Patienten in vitro festzustellen.

1. Zelltoxicität

Die beobachteten Kernveränderungen können als unmittelbarer Ausdruck der hemmenden Wirkung von Daunomycin auf die DNS-Reduplikation angesehen werden (34). Die cytoplasmatischen Veränderungen wie auch den vermehrt anfallenden Zelldetritus führen wir auf die schon erwähnte Hemmung der m-RNS-Synthese und der daraus resultierenden Hemmung der Proteinsynthese zurück.

2. Einfluß von Daunomycin auf die Mitosehäufigkeit und Mitosephasenverteilung

In unseren Kulturen fanden wir nach 8 - 48 Stunden unter 5 µg/ml Daunomycin eine statistisch signifikante ($p < 0,01$) Erniedrigung der sich in Mitose befindenden Zellen, der durchschnittliche wMI (4,5) und rMI (2,4) sind beide gegenüber denen der Kontrollkultur (wMI = 9, rMI = 7) erniedrigt. Die von uns gefundene Erniedrigung des Mitoseindex deckt sich mit den Ergebnissen anderer Untersucher (14, 20) und mit den Ergebnissen unter gleichen Versuchsbedingungen am normalen Knochenmark (43).

Daß diese Senkung des Mitoseindex dosisabhängig sein könnte - der durchschnittliche wMI unter 1 µg/ml Daunomycin unterscheidet sich nicht von dem der Kontrollkulturen - erscheint uns nach der aus der Literatur bekannten Dosisabhängigkeit der Daunomycinwirkung auf

den Nucleinsäurestoffwechsel (11, 32) wahrscheinlich und deckt sich mit Ergebnissen von WHANG-PENG (44), die über eine Dosisabhängigkeit des Mitoseindex berichtet. Da aber nur bei zwei Kulturen Daunomycin auch in der Stärke von 1 µg/ml zugesetzt worden ist, reicht das vorliegende Material nicht aus, die Frage der Abhängigkeit des Mitoseindex von der Daunomycin-Dosis statistisch sicher zu beantworten.

Die von WELT (43) beschriebene geringe relative Zunahme der Prophasen und frühen Metaphasen - im Sinne einer Verlangsamung des Mitoseablaufes - bei "normalen" Knochenmark-Kulturen mit Daunomycinzusatz kann von uns für die leukämische Granulopoese nicht bestätigt werden.

Es ist allerdings fraglich, ob hier wirklich ein unterschiedliches Verhalten von "normalen" und leukämischen Knochenmark-Kulturen vorliegt, da es oft schwierig ist, gerade diese beiden Mitosephasen von Zellen zu unterscheiden, die auf Grund einer Schädigung durch das Cytostatikum ein ähnliches Bild bieten. Wir vermuten daher, daß die antimitotische Wirkung des Daunomycins überwiegend in einer Hemmung der Zellen, in die Mitose einzutreten, beruht, einer Blockierung der Zellen "en post-synthese (préprophase)" (20), entsprechend einer Arretierung in der G_2-Periode (23, 44).

3. Einfluß von Daunomycin auf die Reifung der Granulopoese

Wir untersuchten zuerst das Knochenmark von zwei Patienten mit fraglich beginnender chronisch myeloischer Leukämie und einer Patientin mit chronisch myeloischer Leukämie im akuten Erythro-Myeloblasten-Schub.

BOLL (7) zeigte, daß bei den chronisch myeloischen Leukämien eine Verminderung der Proliferation (Mitoseindex + Reifung) von der Norm nachweisbar ist. Sie führt die Zellvermehrung bei dieser Krankheit daher auf eine vermehrte Umwandlung der myelopoetischen Stammzelle in Myeloblasten und Promyelozyten zurück.

Wir fanden in den drei Versuchen I, II und V nach 72 und 96 Stunden eine - statistisch hoch signifikante - Linksverschiebung der Reifungskurven nach Zusatz von 1 und 5 µg/ml Daunomycin.
Die gemittelten Reifungskurven (Abb. 13, S. 49) dieser Zusatzkulturen weisen nun eine erstaunliche Ähnlichkeit mit der Reifungskurve der normalen Granulopoese auf (S. 12). Aus Abbildung 13 geht hervor, daß es sich bei dieser Linksverschiebung hauptsächlich um eine relative Verminderung der Myeloblasten und Promyelozyten handelt, die man nun wie folgt erklären könnte:

1. Daunomycin hemmt die Umwandlung der myelopoetischen Stammzellen in Myeloblasten und Promyelozyten.
2. Daunomycin verhindert die Vermehrung der Myeloblasten und Promyelozyten.
3. Daunomycin wirkt auf leukämische Myeloblasten und Promyelozyten stärker cytotoxisch als auf die reiferen Formen. Man könnte sich dies etwa auf der Basis einer höheren Daunomycinreduktaseaktivität in diesen Zellen vorstellen.
4. Daunomycin fördert die Reifung in der Granulopoese.

Die vierte Erklärungsmöglichkeit halten wir für unwahrscheinlich, da eine Reifungsbeschleunigung durch ein Zytostatikum schwer vorstellbar ist.

WELT (43) fand bei seinen Untersuchungen der Wirkung von Daunomycin auf nicht-leukämisches Knochenmark eine nur geringgradige Linksverschiebung der Reifungskurven der Granulopoese nach 72 Stunden. Die leukämischen Zellen der weißen Reihe, insbesondere die unreifen Vorstufen, scheinen damit empfindlicher auf Daunomycin zu reagieren als die der nicht-leukämischen Granulopoese.

In den Versuchen III und IV untersuchten wir das Knochenmark von zwei Patienten mit akuter Myeloblasten-Leukämie. Nach BOLL (6) liegt bei den akuten Myeloblasten-Leukämien ein Reifungsblock zwischen Myeloblasten und Promyelozyten vor. Wir interpretierten die Untersuchungen III und IV als Fortbestehen dieser Reifungsstörung, die auch durch Daunomycinzusatz nicht aufgehoben wird.

4. Einfluß von Daunomycin auf die Reifung der Erythropoese

Zuerst untersuchten wir das Knochenmark von zwei Patienten mit fraglich beginnender chronisch myeloischer Leukämie (I und II), dann die von zwei Patienten mit akuter Myeloblasten-Leukämie (III und IV). Nach BOLL (8) reift die Erythropoese bei akuter und chronischer Myelose gut aus, wenn auch bei der chronischen Myelose der Anteil der oxiphilen Erythroblasten erhöht ist. Auch die Regeneration der Erythropoese verhält sich ähnlich der des Normalmarkes. In den drei Versuchen I, II und III fanden wir nach 48 Stunden unter 5 µg/ml Daunomycin nur noch 12,4% teilungsfähige Zellen, in der Kontrolle zum gleichen Stichpunkt 34,3% (Abb. 12). Wir schließen daraus auf eine Schädigung der teilungsfähigen Erythroblasten durch Daunomycin. Diese Schädigung scheint von der Daunomycin-Dosis abhängig zu sein (Abb. 5).

Bei der Kultur V handelt es sich um eine Erythrämie (3). Die relative Zunahme der Paraerythroblasten in der Kontrollkultur sehen wir in der für diese Erkrankung typischen Ausreifungshemmung dieser Paraerythroblasten begründet. Die relative Abnahme der Proerythroblasten nach 24 Stunden unter 1 und 5 µg/ml Daunomycin deuten wir - bei gleichzeitig abgesunkenen rMI - als Regenerationshemmung und bzw. oder durch die Zelltoxicität des Daunomycins bedingt und nicht als Reifungsförderung, da nach 48 Stunden die inzwischen ausgereiften polychromatischen Erythroblasten nicht ersetzt worden sind.

5. Einfluß von Daunomycin auf den G/E-Index Tab. 8, S. 51

Die in Versuch I und II beobachtete Verminderung des G/E-Index nach 72 Stunden unter 5 µg/ml Daunomycin werten wir nicht nur als stärkere Depression der Granulopoese, sondern führen sie auf eine Entkernungshemmung (i.e. eine Hemmung des Kernabbaues) der reifen Erythroblasten zurück, da die Erythropoese in beiden Fällen bereits nach 48 Stunden zu mehr als 74% aus reifen Erythroblasten besteht.

Anders liegt der Fall bei den akuten Leukämien (Versuch III + IV): Da der G/E-Index unter 1 und 5 bzw. 10 µg/ml Daunomycin zu allen Stichzeiten erniedrigt ist und bis 19 Stunden auch die teilungsfähige Erythropoese noch gut vertreten ist, müssen wir hier als weitere Möglichkeit eine stärkere Depression der Granulopoese in Erwägung ziehen. Das unterschiedliche Verhalten der G/E-Indices von Versuch I und II zu III und IV wäre dann in der unterschiedlichen Zusammensetzung ihrer Granulopoese zu suchen: Die Granulopoese von Kultur III und IV besteht zu über 93% aus leukämischen Myeloblasten, die auf Grund ihres 4-9-fach größeren Gehaltes an Daunomycinreduktase

- im Verhältnis zu normalen reifen Leukozyten - zu den daunomycinempfindlichsten Zellen gehört (25). Hier scheint eine cytotoxische Wirkung speziell auf leukämische Myeloblasten möglich zu sein.

Bei der Erythrämie (Versuch V) tritt dieser Effekt auch nach 48 Stunden in Erscheinung. Die Stichprobe nach 72 Stunden fehlt, und nach 96 Stunden kann nach dem nunmehr erhöhten G/E-Index angenommen werden, daß die reifen Erythroblasten inzwischen entkernt sind.

Die hier in fünf Versuchen gezeigten Effekte von Daunomycin - bei den drei chronischen Leukämien die Angleichung der Reifungskurve an die "Normalkurve", bei den zwei akuten Leukämien die relative Abnahme der Myeloblasten zu Gunsten der Erythroblasten - und die höhere Empfindlichkeit der leukämischen Zellen auf Daunomycin im Vergleich zu nicht-leukämischen Zellen (43) stehen im Einklang mit der eingangs beschriebenen guten klinischen Wirksamkeit dieses Medikamentes.

Zusammenfassung

Wir untersuchten die Wirkung von Daunomycin an Knochenmark-Koagulumkulturen von zwei Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie, zwei Patienten mit akuter Myeloblastenleukämie und von einem Patienten mit akutem Erythro-Myeloblastenschub bei chronisch myeloischer Leukämie bis 96 Stunden.

Die Knochenmarkkulturen wurden mit einer Konzentration von 1, 5 und 10 µg/ml Daunomycin und zur Kontrolle ohne Zusatz des Zytostatikums angesetzt.
Wir stellten die Beeinflussung der Zellproliferation in vitro durch das Medikament mittels Reifungskurven, Mitoseindices, G/E-Indices und karyologischer Kurven graphisch und tabellarisch dar und berechneten die Signifikanz.

Unter Daunomycin sehen wir:

1. eine Verringerung der Mitoseindices der Erythro- und Granulopoese zwischen 8 und 48 Stunden,
2. eine relative Abnahme der regenerationsfähigen Zellen der nicht-leukämischen Erythropoese nach 8 - 48 Stunden, eine relative Abnahme der Myeloblasten und Promyelozyten bei den chronisch myeloischen Leukämiekulturen nach 72 - 96 Stunden - auch im akuten Blastenschub - und eine Abnahme der G/E-Indices nach 11 - 36 Stunden bei den akuten Myeloblastenleukämien.

Wir bemerkten eine höhere Empfindlichkeit der leukämischen Zellen in vitro von fünf Patienten im Vergleich zu nicht-leukämischen Zellen (WELT).

A n h a n g

I. Werte der Signifikanzberechnung für

1. Mitosen gegen Ruhekerne der 8 - 48 Stunden-Kulturen mit Zusatz von 5 µg/ml Daunomycin und der entsprechenden Kontrollkulturen:

B_M -Kontrolle = 89 B_N -Kontrolle = 11776
-Zusatz = 41 -Zusatz = 9736

$(B_M-E_M)^2/E_M$ der Kontrollkulturen = 4,3940
der Zusatzkulturen = 5,3371
$(B_N-E_N)^2/E_N$ der Kontrollkulturen = 0,0266
der Zusatzkulturen = 0,0322

$\chi^2 = 9,7899$ $0,01 > p > 0,001$ (signifikant)

2. Mitosen gegen Ruhekerne der 8 - 48 Stunden-Kulturen mit Zusatz von 1 µg/ml Daunomycin und der entsprechenden Kontrollkulturen:

B_M -Kontrolle = 35 B_N -Kontrolle = 8029
-Zusatz = 28 -Zusatz = 6156

$(B_M-E_M)^2/E_M$ der Kontrollkulturen = 0,0137
der Zusatzkulturen = 0,0180
$(B_N-E_N)^2/E_N$ der Kontrollkulturen = 0,0001
der Zusatzkulturen = 0,0001

$\chi^2 = 0,0319$ $0,95 > p > 0,05$ (nicht signifikant)

B_M = Beobachtungswert der Mitosen
B_N = Beobachtungswert der Nicht-Mitosen (Ruhekerne)
E_M = Erwartungswert der Mitosen
E_N = Erwartungswert der Nicht-Mitosen

II. Werte der Signifikanzberechnung für die Reifungskurven der Granulopoese

	Versuch I 72 Stunden $(B-E)^2/E$		Versuch II 72 Stunden $(B-E)^2/E$		Versuch V 96 Stunden $(B-E)^2/E$			
	K	Z	K	Z	K	z	K	Z
Mb	0,01	0,00	2,04	2,50	86,78	42,40	86,78	43,74
Pmy	2,64	7,07	17,91	21,63	244,34	119,11	355,34	177,91
My	38,89	104,97	3,00	3,66	6,23	3,05	5,76	2,89
Eo	1,01	2,71	14,31	17,27	6,55	3,20	18,90	9,59
PM	7,09	18,62	17,35	21,09	29,46	14,50	44,68	22,64
MM	0,02	0,06	0,16	0,21	12,42	6,14	20,14	10,21
Stab	23,92	64,62	12,77	15,43	26,23	12,75	27,53	13,95
Seg	7,40	19,90	29,11	35,49	87,26	42,71	68,02	34,43
Eo	8,78	23,92	7,14	8,59	44,63	21,68	46,78	23,57
Mo	2,35	6,32	0,04	0,06				

$\chi^2 = 340,28$ $\chi^2 = 229,76$ $\chi^2 = 809,44$ $\chi^2 = 1012,85$

$^{*}P < 0,001$ $^{*}P < 0,001$ $^{*}P < 0,001$ $^{*}P < 0,001$

B = Beobachtungswert
E = Erwartungswert
K = Kontrollkultur
z = Kultur mit Zusatz von 1 µg/ml Daunomycin
Z = Kultur mit Zusatz von 5 µg/ml Daunomycin
* = hochsignifikant

Literaturverzeichnis

1. Alberts, D.S., Bachur, N.R. und Holtzmann, J.L.:
The pharmacokinetics of daunomycin in man.
Clin. Pharmacol. Ther. 12, 96 (1971)

2. Arcamone, F., Cassinelli, G., Orrezi, P., Franceschi, G. und Mondelli, R.:
Daunomycin-II the structure and stereochemistry of daunosamine.
J. Amer. Chem. Soc. 86, 5335 (1964)

3. Aust, C. und Boll, I.:
Entwicklung von Di Guglielmo-Syndromen aus chronischen myeloischen Leukämien.
Blut 28, 245 (1974)

4. Baudo, F., Camera, G., Cipriani, D., Cataldo, F. de, Pensabene, A., Tiso, R. und Bussi, L.:
Daunomycin-Preliminary results of the treatment of acute leucemias in adults.
Oncol. 22, 67 (1968)

5. Bernard, J., Jacquillat, Cl., Boiron, M., Najean, Y., Seligmann, M., Tanzer, J., Weil, M. und Lortholari, P.:
Essai de traitement des leucémies algues lymphoblastique et myéloblastique par un antibiotique nouveau: La rubidomycine.
Presse med. 75, 951 (1967)

6. Boll, I.:
Einführung in den Gesprächskreis "Proliferationskinetik der Leukämien"
In Leukämie. Gross, R/van de Loo, J., Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York S. 62 (1972)

7. Boll, I.:
Granulocytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1966)

8. Boll, I. und Mersch, G.:
Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Erythropoese in vitro.
Blut 17, 193 (1968)

9. Bonnadonna, G. und Monfardini, S.:
Cardiac toxicity of daunorubicin.
The Lancet, 1, 837 (1969)

10. Costa, G. und Astaldi, G.:
Effect of daunomycin on the proliferative activity of stemcells developed from human lymphocytes.
Tumori 50, 477 (1964)

11. Costa, G. und Astaldi, G.:
Effetto inhibente della daunomicina sull evoluzione staminale dei linfociti.
Gazz. internat. di med. e chir. 70, 597 (1965)

12. Dano, K. Nissen, N.I., Pedersen-Bjergaard, J. und Thiede, T.:
Rubidomycin-Behandlung der akuten myeloischen Leukämie.
Nord - Med. 80, 1475 (1968)

13. Di Marco, A.:
Daunomycin pharmacological activity at the cellular level.
Path. Biol. 15, 897 (1967)

14. Di Marco, A.:
Mechanism of action of daunomycin.
Acta Genet. med. (Roma), 17, 102 (1968)

15. Di Marco, A., Silvestrini, S., Di Marco S. und Dasdia, T.:
Inhibiting effect of the new cytotoxic antibiotic, Daunomycin, on nucleic acids and mitotic activity of HeLa cells.
J. Cell. Biol. 27, 545 (1965)

16. Di Marco, A., Gaetani, M., Dorigatti, L., Soldati, M. und Bellini, O.:
Daunomycin - A new antibiotic with antitumor activity.
Tumori 49, 203 (1963)

17. Di Marco, A., Gaetani, M., Dorigatti, L., Soldati, M. und Bellini, O.:
Daunomycin - A new antibiotic with antitumor activity.
Cancer Chemother. Rep. 38, 31 (1964)

18. Di Marco, A., Gaetani, M., Orrezi, P. und Soldati, M.:
Antitumor activity of a new antibiotic, daunomycin.
In, Proceedings of the Third International Congress of Chemotherapie, G. Thieme, Stuttgart, S. 1023 (1964)

19. Dubost, M., Ganter, P., Moral, R., Ninet, L., Pinnert, S., Preud'homme J. und Werner, G.-H.:
Rubidomycin: a new antibiotic with cytostatic properties.
Cancer Chemother. Rep. 41, 35 (1964)

20. Gauthier, M.-P. und Bassleer, R.:
Altérations cytologiques et modifictions des synthèses d'acides désoxyribonucléiques dans des fibroblastes de pulet cultivés in vitro en présence de Daunomycine.
C.R. Acad. Sc. Paris, 272, 723 (1971)
Série D

21. Gerhartz, H.:
Chemotherapie der akuten Leukämien.
Dtsch. med. Wschr. 52, 2371 (1967)

22. Grein, A., Spalla, C., Di Marco, A. und Canevazzi, G.:
Descrizione e classificazione di un attinomicete (streptomyces peucetius sp. nova) produttora di una sostanza ad attivita antitumorale - La Daunomycina.
Giom. Microbiol. 11, 109 (1963)

23. Göhde, W. und Dittrich, W.:
Die cytostatische Wirkung von Daunomycin im Impulscytophotometrie-Test
Arzneim. Forsch. 21, 1656 (1971)

24. Huffman, D.H., Bachur, N.R. und Gee, M.:
Hematological metabolism of daunomycin in man.
Clin. Res. 18, 474 (1970)

25. Huffman, D.H., Benjamin, R.S. und Bachur, N.R.:
Daunorubicin metabolism in acute nonlymphocytic leukemia.
Clin. Pharmacol. Ther. 13, 895 (1972)

26. Huffman, D.H. und Bachur, N.R.:
Daunorubicin metabolism by human hematological components.
Cancer Res. 32, 600 (1972)

27. Huffman, D.H. und Bachur, N.R.:
Daunorubicin metabolism in acute myelocytic leukemia.
Blood 39, 637 (1972)

28. Kersten, W. und Kersten, H.:
Die Bindung von Daunomycin, Cinerubin und Chromomycin A_3 an Nucleinsäuren.
Biochem. Zeitschr. 341, 174 (1965)

29. Marmont, A.M., Damasio, E. und Rossi, F.:
Cardiac toxicity of daunorubicin.
The Lancet 1, 837 (1969)

30. Mathe, G., Hayat, M., Schwarzenberg, L., Amiel, J.-L., Schneider, M., Cattan, A., Schlumberger, J.-R. und Jasmin, C.L.:
Haute frequence et qualité des remissions de la leucemie algue lymphoblastique chez l'enfant.
Arch. franç. Pédiat. 25, 181 (1968)

31. Meriwether, W.D., Bachur, N.R. und Gee, M.:
Inhibition of DNA und RNA metabolism by daunorubicin (D_1) and its major metabolite (D_2) in L 1210 mouse leukemia.
Clin. Res. 19, 494 (1971)

32. Nakamura, T.:
Zytostatikum Daunomycin bremst das Wachstum experimenteller Tumorzellen.
Med. Trib. World wide report, 25 (1969)

33. Sachtleben, P., Binder. H., Krämer, D., Weyrich, C. und Schwartz, W.:
Zur Kombinationsbehandlung der akuten Leukämie des Kindes mit Dauno-Rubidomycin.
Dtsch. med. Wschr. 39, 1972 (1969)

34. Silvestrini, R., Di Marco, A., und Dasdia, T.:
Interference of Daunomycin with metabolic events of the cell cycle in synchronized cultures of rat fibroblasts.
Cancer Res. 30, 966 (1970)

35. Sinkus, A.G.:
Cytogenetic effect of rubomycin C in a culture of human lymphocytes. Chromosomal aberration at the G 2 stage of the mitotic cycle (Russian)
Genetika (Leningrad), 8, 138 (1972)

36. Shore, N.A.:
Daunomycin bei akuter Leukämie im Kindesalter.
Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 10, 80 (1969)

37. Skeel, R.T., Bertino, J.R. und Creasey, W.A.:
Clinical and pharmacologic studies with daunorubicin in acute leucemia.
Clin. Res. 18, 476 (1970)

38. Soulié, J.:
Rubidomycin, ein neues Antibiotikum mit antiblastischer Wirkung.
Minerva Med. 59, 5236 (1968)

39. Tan, C. und Tasaka, H.:
Daunomycin, remissions in acute leukemia.
Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 7, 278 (1966)

40. Tan, C., Tasaka, H. und Di Marco, A.:
Clinical studies of Daunomycin.
Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 6, 253 (1965)

41. Tan., C., Tasaka, H., Yu, K.-P., Murphy, M.L. und Karnofsky, D.A.:
Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease.
Cancer 20, 333 (1967)

42. Ward, D.C., Reich, E. und Goldberg, I.H.:
Base specificity in the interaction of polynucleotides with antibiotic drugs.
Science 149, 1259 (1965)

43. Welt, W.:
Die Einwirkung von Daunomycin auf menschliches Knochenmark in vitro.
Dissertation, Freie Universität Berlin, 1973

44. Whang-Peng, J., Leventhal, B.G., Adamson, J.W. und Perry, S.:
The effect of Daunomycin of human cells in vivo and in vitro.
Cancer 23, 113 (1969)

Mein herzlichster Dank gilt Frau Professor
Dr. med. Irene Boll für die Überlassung
des Themas und für ihre jederzeit hilfreiche
Unterstützung
und Herrn Professor Dr. H.-J. Bellitz, Freie
Universität Berlin, für seine Unterweisung
in der Durchführung der Signifikanzberechnung.

DIE ARBEIT WURDE DURCH DIE DEUTSCHE FORSCHUNGS-
GEMEINSCHAFT UNTERSTÜTZT.

Lebenslauf

Am 31.1.1948 wurde ich, Karl-Ulrich Buch, als Sohn des Arztes Dr. Karl-Ernst Buch und seiner Ehefrau Christel, geb. Soschinski, in Berlin geboren.

Meine Schulzeit (1954 - 1967) absolvierte ich in Berlin, wo ich 1967 das Abitur bestand.

Am 25.5.1967 wurde ich an der medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin immatrikuliert.

Am 18.3.1968 bestand ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung, am 24.3.1970 die ärztliche Vorprüfung und am 3.8.1973 die ärztliche Prüfung.

Acht Monate meiner Medizinalassistentenzeit leistete ich in der Zeit vom 1.11.1973 bis zum 30.6.1974 auf der chirurgischen und inneren Abteilung des Klinikum Westend ab.

Seit dem 21.10.1974 arbeite ich als Medizinalassistent im Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin.

B. Ladewig - Dissertationsdruck - 1 Berlin 12 - Pestalozzistraße 106
Tel.: 3128885 - 3138198